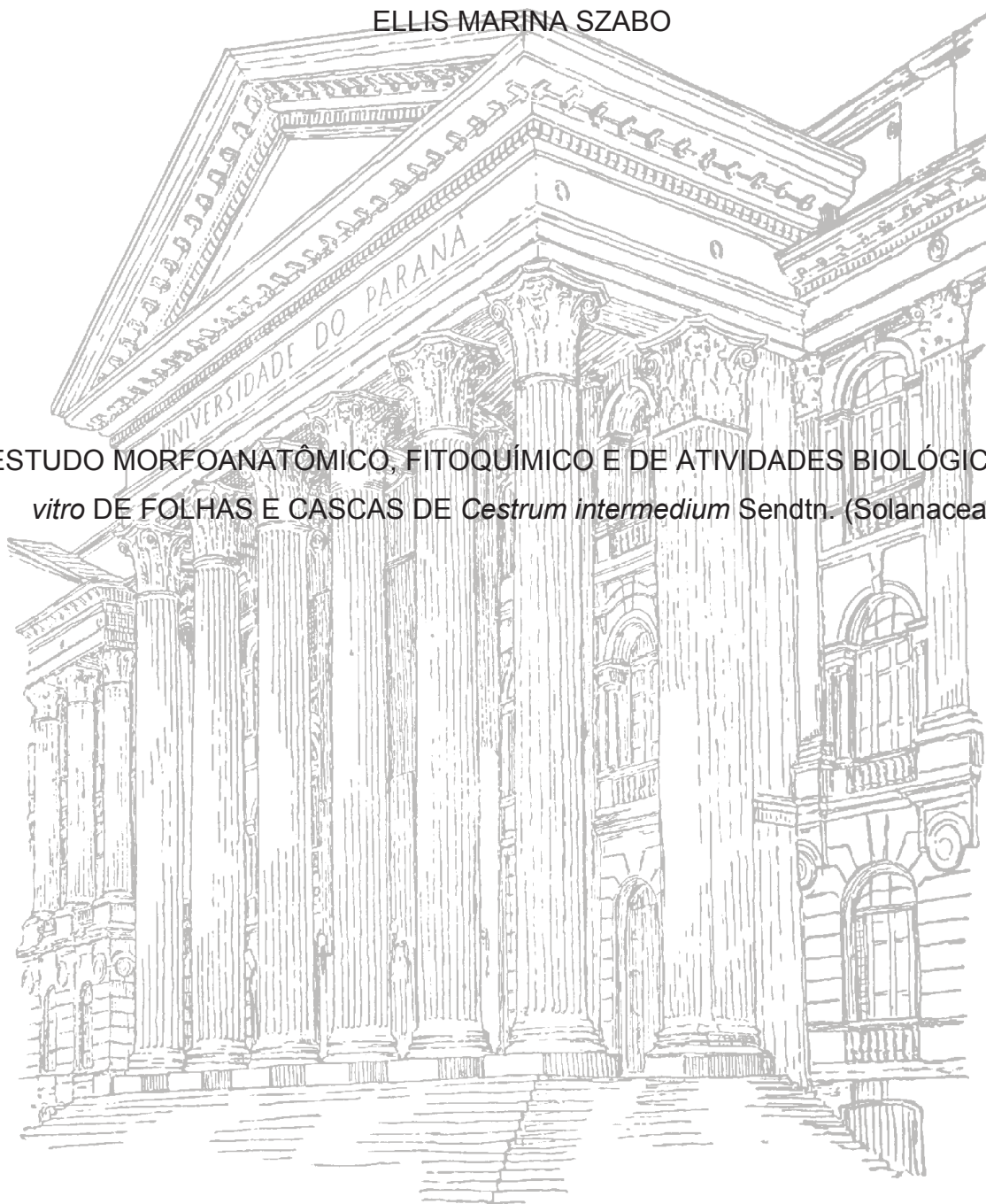


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELLIS MARINA SZABO

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* DE FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae)



CURITIBA

2020

ELLIS MARINA SZABO

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* DE FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae)

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Ciências Farmacêuticas ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Coorientador: Prof. Dr. Vinícius Bednarczuk de Oliveira

CURITIBA

2020

Szabo, Ellis Marina

Estudo morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas *in vitro* de folhas e cascas de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae) [recurso eletrônico] / Ellis Marina Szabo – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Prof. Dr. Vinicius Bednarczuk de Oliveira

1. Solanaceae. 2. *Cestrum*. 3. Alelopatia. 4. Toxicidade. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Oliveira, Vinicius Bednarczuk de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.9593



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ELLIS MARINA SZABO** intitulada: **ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS in vitro DE FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae)**, sob orientação do Prof. Dr. OBDULIO GOMES MIGUEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica
16/09/2020 17:14:47.0
OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
19/10/2020 11:31:22.0
YANNA DANTAS RATTMANN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
24/09/2020 08:50:02.0
ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
16/09/2020 20:16:11.0
DEISE PREHS MONTRUCCHIO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
21/09/2020 14:02:22.0
FLAVIA LADA DEGAUT PONTES
Avaliador Externo (null)

Dedico este trabalho aos meus pais, Ademilde e Luiz, meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus. Pela vida, iluminação de caminhos e vivências.

Aos meus pais, pela vida que me deram e permitiram viver; pelos esforços, sacrifícios, pelas oportunidades e lutas... Por todo o acolhimento, apoio, conforto e amor. Obrigada por participarem de toda a conquista, etapa dolorida, amadurecimento e evolução. Sem vocês nada teria sentido. Amo muito vocês.

Ao Bruno, meu companheiro de vida. Quem me acompanha, apoia, acalma e ensina acalmar, mostra o lado bom de tudo e o que é ser parceiro. Você faz parte de tudo e (mais) essa conquista é nossa. Amo muito você.

À Tita pelas contribuições em toda da minha vida, pelo incentivo perene, conversas densas mas libertadoras e exemplo de coragem. Amo você!

Aos meus amigos, perto ou longe em distância, mas sempre presentes no meu coração.

À Prof. Dra. Amiga Vizinha Irmã Isabel Christina Mignoni Homem por fazer parte desta trajetória desde o início, dividindo ideias, conselhos, risadas e muito crescimento. Obrigada por ser quem você é e estar aonde está. Amo você ♥

À Flávia Deffert, que além de grande amiga há tantos anos, foi essencial para o andamento deste trabalho. Obrigada pelo suporte, empurrão, colo e dedicação. Você é muito importante para mim. Amo você ♥

À equipe FEM, a melhor que se pode ter! Vocês são incríveis e agradeço por termos nos encontrado. Obrigada pelo incentivo, apoio e ajustes para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida. Agradeço especialmente às queridas amigas Ale (chefana), Carol, Jessi, Mirtoca e Neusinha: vocês são vida ♥

Ao corpo docente e discente de Farmácia IFPR- Palmas-PR, pelo acolhimento, experiência inesquecível e contribuição pessoal e profissional. Em especial, agradeço às Prof. Katia Caroline França Dalanhol e Lucélia Magalhães da Silva pela receptividade, amizade e contribuição fundamental. Obrigada!

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade, estrutura e recursos.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o período como bolsista.

Aos orientadores, Obdulio Gomes Miguel e Vinícius Benardczuk de Oliveira, e Marilis Dallarmi Miguel pela confiança, paciência, apoio e incentivo.

Agradeço de todo o coração à Katlin Suellen Rech pela parceria, paciência, acolhimento e direcionamento. Tua dedicação foi essencial para esta conquista, serei eternamente grata pela tua contribuição. Obrigada ♥

À Flavia Lada Degaut pelo acolhimento, aconselhamento, auxílio e direcionamento. O mundo seria um lugar melhor se houvessem mais pessoas como você! Muito obrigada por tudo ♥

À Prof. Dra. Ana Luiza Lacava Lordello pela imensurável contribuição ao trabalho, acolhimento e dedicação sem medida em meio à pandemia. Muitíssimo obrigada!

Aos Prof. Dr. Josiane Dias, Sandra Zanin e Victor Kerber pelo conhecimento compartilhado e convivência.

Aos companheiros de trajetória, Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Isabel Christina Mignino Homem, Ana Flávia Schvabe, Fernando Betim, Vanessa Barbosa, Francis Merino, Maislian de Oliveira e Cristiane Bezerra da Silva, pelo grande apoio, parceria e momentos descontraídos.

Às colegas da Juliane Nadal, Flavia Lada Degaut, Mariana Fachi, Yohanns Martinez Moncada e Cristiane Bezerra da Silva pela disposição, apoio e auxílio no andamento do trabalho.

Aos Prof. Dra. Ana Luiza Lacava Lordello, Dr. Roberto Pontarolo, Dra. Caroline da Ros Montes D'oca, Dr. Anderson Barison da Universidade Federal do Paraná, Prof. Bruno Gavinho da UNIANDRADE e Prof. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela estrutura cedida, auxílio e generosidade.

Ao curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba Osmar dos Santos Ribas, pela receptividade, identificação e depósito do material botânico.

Aos técnicos, Graça e Paulo, pelo auxílio e cordialidade.

Aos secretários, Ednéia e Gustavo, pela paciência, auxílio e prestatividade.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta e não foram mencionados.

*No one can whistle a symphony.
It takes a whole orchestra to play it.*

H.E. Luccock

RESUMO

O presente trabalho reúne caracterizações inéditas de *Cestrum intermedium*, espécie nativa do Brasil conhecida como mata-boi. Sendo responsável por ocasionar intoxicação ao gado bovino quando ingerida, é considerada uma das plantas tóxicas mais importantes na região sul. Os parâmetros físico-químicos de folhas e cascas foram determinados por métodos farmacopeicos (teor de umidade/teor de cinzas: 8,54%/11,34% para folhas e 8,19%/5,24% para cascas) e por termogravimetria (3 etapas definidas em folhas e 4 etapas definidas para cascas), estabelecendo padrões característicos da espécie, além de parâmetros de comparação para futuras análises. A análise morfoanatômica de folhas e caules delineou atributos comuns ao gênero: epiderme uniseriada, folhas hipostomáticas e estômatos anomocíticos. A ausência de tricomas além do feixe vascular em formato de C em folhas e pecíolos, diferencia *C. intermedium* de grande parte das espécies do gênero já descritas. A avaliação histoquímica evidenciou a presença de alcaloides e terpenoides em folhas, pecíolos e caules. O estudo fitoquímico identificou a presença dos sais inorgânicos Nitrato de Potássio e Carbonato de Sódio Dihidratado, dos alcaloides Alantoína e componente majoritário dos extratos de folhas e cascas (alcaloide β -carbolínico em processo de elucidação). A avaliação de atividade alelopática em *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) investigou a influência de *Cestrum intermedium* na germinação de sementes e crescimento de hipocótilos e radículas. De maneira geral, a germinação da alface foi inibida pelos extratos brutos de folhas e cascas, assim como pelo componente majoritário, na concentração máxima avaliada (1000 $\mu\text{g/mL}$), enquanto não foram observadas influências significativas no crescimento de radículas e hipocótilos. Em relação à cebola, a germinação foi inibida pelo extrato bruto das folhas (750 $\mu\text{g/mL}$), enquanto o crescimento não sofreu influência significativa pelas amostras. Foi observada atividade citotóxica ($\text{IC}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) em diferentes linhagens tumorais em investigação preliminar pela frações acetato de etila das cascas, clorofórmio das folhas e cascas, assim como hexano das folhas. A atividade tóxica em *Leishmania infantum* ($\text{IC}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) foi observada na fração acetato de etila das cascas, enquanto a toxicidade sobre o protozoário *Giardia intestinalis* não foi considerada significativa. Portanto, apesar de sua conhecida toxicidade, a especial vegetal demonstrou potencial farmacológico nos estudos *in vitro*.

Palavras-chave: morfoanatomia; alcaloide β -carbolínico; alelopatia; citotoxicidade.

ABSTRACT

This study gathers unprecedented features of *Cestrum intermedium*, a species native to Brazil known as mata-boi (cow-killer). This species is responsible for toxicity to bovine cattle when ingested, being considerate as one of the most important toxic plants in southern region. Leaves and barks physical-chemical parameters were determined through pharmacopeia (humidity (%)/ash (%): 8,54%/11,34% for leaves and 8,19%/5,24% for barks) and thermogravimetric methods (3 defined steps on leaves and 4 defined steps on barks), establishing species' patterns, in addition to comparative standards to future analysis. Leaves and stems morphoanatomical analysis indicated common genus features, such as: uniseriate epidermis, hypostomatic leaves and anomocytic stomata. Trichomes absence and leaves' and petioles' C shaped vascular bundles differentiates *C. intermedium* from majority of genus' described species. Histochemical evaluation revealed alkaloids and terpenoids in leaf, petiole and stem. Phytochemical analysis indicated organic salts: Potassium Nitrate and Dihydrated Sodium Carbonat;, alkaloids: Allantoin and leaves and barks major compound (β -carboline alkaloid not fully identified) to be present. Allelopathic study was carried in *Lactuca sativa* (lettuce) e *Allium cepa* (onion), evaluating *Cestrum intermedium* influence in germination and development of radicles and hypocotyls. No influences were observed in structures development, but germination process was inhibited by leaves and barks crude extract and its major compound in maximum concentration (1000 $\mu\text{g/mL}$) on *L. sativa* and leaves crude extract (750 $\mu\text{g/mL}$) on *Allium cepa*. Cytotoxic activity ($\text{IC}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) was observed in different tumor lineages on preliminary investigation for barks ethyl acetate fraction, leaves and barks chloroform fractions and leaves hexane fraction. Samples toxic activity in *Leishmania infantum* ($\text{IC}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) was observed for barksq ethyl acetate fraction and while no significant toxicity was observed on *Giardia intestinalis*. Despite its toxicity, this species demonstrated pharmacological potential in *in vitro* studies.

Key-words: morphoanatomy; β -carboline alkaloid; allelopathy; cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA SOLANACEAE.....	24
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Cestrum</i>	25
FIGURA 3 – EXSICATA DE <i>Cestrum intermedium</i>	29
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO DE <i>Cestrum intermedium</i> NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.....	30
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM SZABO (2015).....	31
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DE PALMITATO DE LUPEOL.....	32
FIGURA 7 – BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS.....	36
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ALCALOIDES PURÍNICOS.....	38
FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DO NÚCLEO INDOL, SEROTONINA E PSILOCINA.....	39
FIGURA 10 – PRECURSORES TRIPTOFANO E TRIPTAMINA FORMANDO O NÚCLEO BÁSICO DE ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS (HARMANO).....	41
FIGURA 11 – ESTRUTURA GERAL DE ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS.....	41
FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS COM <i>Cestrum intermedium</i>	44
FIGURA 13 – MATERIAL BOTÂNICO FRESCO: PREPARO PARA PROCESSAMENTO.....	45
FIGURA 14 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS CETÔNICOS, PÓS- CETÔNICOS E FRAÇÕES.....	50
FIGURA 15 – COMPONENTE MAJORITÁRIO (MAJ): PRECIPITADO AMARELO NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO BRUTO PÓS-CETÔNICO DAS CASCAS.....	51
FIGURA 16 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES....	52
FIGURA 17 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>Cestrum intermedium</i>	54
FIGURA 18 – PLACAS GERBOX DIVIDIDAS EM QUADRANTES.....	58
FIGURA 19 – RAMOS RECÉM-COLETADOS DE <i>Cestrum intermedium</i>	68
FIGURA 20 – FOLHA DE <i>Cestrum intermedium</i> EM VISÃO FRONTAL.....	69
FIGURA 21 – FOLHA DE <i>Cestrum intermedium</i> EM VISÃO TRANSVERSAL.....	70
FIGURA 22 – PECÍOLO DE <i>Cestrum intermedium</i>	71
FIGURA 23 – CAULE DE <i>Cestrum intermedium</i>	72
FIGURA 24 – TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA, PECÍOLO E CAULE DE <i>C. intermedium</i>	76
FIGURA 25 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS NO ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Cestrum intermedium</i>	79
FIGURA 26 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DE PPTEBC1 - NITRATO DE POTÁSSIO.....	80
FIGURA 27 – ESTRUTURA QUÍMICA DO NITRATO DE POTÁSSIO.....	80
FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AEF100 (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K).....	82
FIGURA 29 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 11,0-8,50 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA AEF100 (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K).....	83
FIGURA 30 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,0-5,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA AEF100 (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K).....	83

FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA AEF100 (50 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K).....	84
FIGURA 32 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ALANTOÍNA.....	84
FIGURA 33 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS, CETÔNICOS E PÓS-CETÔNICOS DAS FOLHAS.....	86
FIGURA 34 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS, CETÔNICOS E PÓS-CETÔNICOS DAS CASCAS.....	87
FIGURA 35 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO COMPONENTE MAJORITÁRIO (MAJ).....	89
FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	90
FIGURA 37 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 12,0-8,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	90
FIGURA 38 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 8,5-7,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	91
FIGURA 39 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 6,0-4,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	91
FIGURA 40 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 3,0-0,5 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	92
FIGURA 41 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)....	92
FIGURA 42 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 175,0-165,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	93
FIGURA 43 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 150,0-110,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	93
FIGURA 44 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 75,0-45,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	94
FIGURA 45 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 45,0-35,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	94
FIGURA 46 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 30,0-15,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K).....	95
FIGURA 47 – ESQUELETO BASE DA ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPONENTE MAJORITÁRIO.....	96
FIGURA 48 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA MAJ E DA AMOSTRA CF150 (400 E 600 MHz, RESPECTIVAMENTE; $\text{DMSO}-d_6$).....	97
FIGURA 49 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ E DA AMOSTRA CF150 (100 E 150 MHz, RESPECTIVAMENTE; $\text{DMSO}-d_6$).....	98
FIGURA 50 – ESPECTRO DE DEPT 135 DE ^{13}C DA AMOSTRA CF150 (150 MHz; $\text{DMSO}-d_6$).....	98
FIGURA 51 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (HSQC) PARA A AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K).....	99
FIGURA 52 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 8,85, 8,38 E 8,18 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K).....	99

FIGURA 53 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 7,77, 7,60 E 7,31 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; DMSO- d_6 ; 294K).....	100
FIGURA 54 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 5,58, 4,32, 2,88, 1,54 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; DMSO- d_6 ; 294K).....	100
FIGURA 55 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 1,66, 1,54, 0,89 E 0,86 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; DMSO- d_6 ; 294K).....	101
FIGURA 56 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS AMOSTRAS CF100-103, CF 108-112, E CF 106-108 (600 MHz).....	103
FIGURA 57 – ESPECTRO RMN DE ^1H DA AMOSTRA CF100-103.....	104
FIGURA 58 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,8-7,4 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA CF 100-103 (600 MHz; CDCl_3 ; 294K).....	104
FIGURA 59 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) PARA A AMOSTRA CF 100-103 (600 MHz; CDCl_3 ; 294K).....	105
FIGURA 60 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 7,70 E 7,52 DA AMOSTRA CF 100-103 (600 MHz; CDCl_3 ; 294K).....	105
FIGURA 61 – ESTRUTURA QUÍMICA PARCIALMENTE ELUCIDADA DE CF100-103 – FTALATO.....	106
FIGURA 62 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO OU FAVORECIMENTO NA GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> COMPARANDO AS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À ÁGUA E DMSO 1% AO LONGO DE SETE DIAS.....	108
FIGURA 63 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO OU FAVORECIMENTO NA GERMINAÇÃO DE <i>Allium cepa</i> COMPARANDO AS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À ÁGUA E DMSO 1% AO LONGO DE SETE DIAS.....	118
FIGURA 64 – INTERFERÊNCIA DE <i>Cestrum intermedium</i> NA PRODUÇÃO DE NOSi EM MACRÓFAGOS INFECTADOS ($\mu\text{M NO}_2^-$).....	130

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA FILOGENÉTICA DE <i>Cestrum</i> BASEADA EM CRONQUIST (1981).....	26
QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>Cestrum</i> BASEADA EM SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	26
QUADRO 3 – ATIVIDADES E METABÓLITOS RELATADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Cestrum</i>	28
QUADRO 4 – METABÓLITOS PRESENTES EM FOLHAS E CASCAS DE <i>Cestrum intermedium</i>	31
QUADRO 5 – ENSAIOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES REALIZADOS EM <i>Cestrum intermedium</i> por SZABO (2015).....	33
QUADRO 6 – REATIVOS UTILIZADOS NO ESTUDO HISTOQUÍMICO DE <i>Cestrum intermedium</i>	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	TEOR DE UMIDADE, CINZAS E DENSIDADE APARENTE DE FOLHAS E CASCAS DE <i>Cestrum intermedium</i>	65
TABELA 2 –	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DE FOLHAS E CASCAS DE <i>C. intermedium</i>	67
TABELA 3 –	ANÁLISE TÉRMICA E TERMOGRAVIMÉTRICA DE FOLHAS E CASCAS DE <i>Cestrum intermedium</i>	67
TABELA 4 –	COMPARAÇÃO DE <i>Cestrum intermedium</i> A OUTRAS ESPÉCIES <i>Cestrum</i> DESCRITAS EM LITERATURA.....	74
TABELA 5 –	COMPOSTOS DETECTADOS NO ENSAIO HISTOQUÍMICO EM <i>C. intermedium</i>	77
TABELA 6 –	TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO CETÔNICO E PÓS-CETÔNICO DE <i>C. intermedium</i>	78
TABELA 7 –	RENDIMENTO DOS EXTRATOS CETÔNICO E PÓS-CETÔNICO DE <i>C. intermedium</i>	78
TABELA 8 –	BANDAS CARACTERÍSTICAS DE NITRATO DE POTÁSSIO EM INFRAVERMELHO.....	81
TABELA 9 –	PARÂMETROS OBTIDOS EM DIFRAÇÃO DA AMOSTRA PPTEBC2.....	81
TABELA 10 –	DADOS DE RMN ¹ H E ¹³ C{ ¹ H} (200 E 50 MHz, RESPECTIVAMENTE) DA AMOSTRA AEF100EM DMSO- <i>d</i> ₆ A 294K.....	84
TABELA 11 –	PARÂMETROS OBTIDOS EM DIFRAÇÃO DA AMOSTRA AEC140.....	85
TABELA 12 –	DADOS DE RMN ¹ H (400 MHz) EM DMSO- <i>d</i> ₆ A 303K DA AMOSTRA MAJ.....	95
TABELA 13 –	DADOS DE RMN ¹ H (600 MHz) EM DMSO- <i>d</i> ₆ A 303K DA AMOSTRA CF 150.....	102
TABELA 14 –	DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C{ ¹ H} DA AMOSTRA CF100-103 EM CDCl ₃	106
TABELA 15 –	PERFIL DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> : COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA).....	110
TABELA 16 –	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> AO LONGO DE 7 DIAS.....	111
TABELA 17 –	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> AO LONGO DE SETE DIAS: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS.....	112
TABELA 18 –	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO, VELOCIDADE MÉDIA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS EM <i>L. sativa</i>	113
TABELA 19 –	PERFIL DE GERMINAÇÃO DE <i>Allium cepa</i> : COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA).....	120
TABELA 20 –	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE <i>Allium cepa</i> AO LONGO DE SETE DIAS...	120
TABELA 21 –	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE <i>Allium cepa</i> AO LONGO DE SETE DIAS: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS.....	121
TABELA 22 –	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO, VELOCIDADE MÉDIA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS EM <i>Allium cepa</i>	122
TABELA 23 –	ATIVIDADE CITOTÓXICA (IC ₅₀ (µg/mL)) DAS AMOSTRAS EM LINHAGENS TUMORAIS.....	126
TABELA 24 –	IC ₅₀ (µg/mL) DOS EXTRATOS DE FOLHAS E CASCAS DE <i>C. intermedium</i> SOBRE <i>Leishmania infantum</i> e macrófagos RAW 264.7.....	128

LISTA DE GRAFICOS

GRÁFICO 1 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>Cestrum intermedium</i>	66
GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> NAS AMOSTRAS COMPARADAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET.....	109
GRÁFICO 3 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE <i>Lactuca sativa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET (95% DE CONFIANÇA).....	114
GRÁFICO 4 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE <i>Lactuca sativa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA).....	115
GRÁFICO 5 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE <i>Lactuca sativa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET (95% DE CONFIANÇA).....	116
GRÁFICO 6 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE <i>Lactuca sativa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA).....	116
GRÁFICO 7 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE <i>Allium cepa</i> NAS AMOSTRAS COMPARADAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET.....	119
GRÁFICO 8 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE <i>Allium Cepa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET (95% DE CONFIANÇA).....	123
GRÁFICO 9 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE <i>Allium cepa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA).....	124
GRÁFICO 10 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE <i>Allium cepa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET (95% DE CONFIANÇA).....	125
GRÁFICO 11 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE <i>Allium cepa</i> : COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA).....	125
GRÁFICO 12 – ATIVIDADE DE <i>Cestrum intermedium</i> NA ADESÃO DE TROFOZOÍTOS.....	132

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%G – Porcentagem de Germinação
ANOVA – Análise de Variância
APG – Angiosperm Phylogeny Group
ATCC – American Type Culture Collection
ATR/FTIR - Espectroscopia em Infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada
 β C – Alcaloide β -carbolínico
BZ – Benzodiazepínicos
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Arranjo de Diodos
CLC – Cromatografia Líquida em Coluna
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CO₂ – Dióxido de Carbono
DH β C – Alcaloide di-hidro- β -carbolínico
DMSO - Dimetilsulfóxido
DMT – N-N-dimetiltriptamina
EBC – Extrato Bruto Etanólico das Cascas
EBCet – Extrato Bruto Cetônico
EBF - Extrato Bruto das Folhas
EBPCet – Extrato Bruto Pós-cetônico
ECA – Enzima Conversora da Angiotensina
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAA – Formalin-Aceto-Alcohol
H₃PO₄ – Ácido Fosfórico
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
IC₅₀ – Concentração Inibitória a 50% dos indivíduos
IMAO – Inibidores de monoamino-oxidase
IVG – Índice de Velocidade de Germinação
KNO₃ – Nitrato de Potássio
LSD – Dietilamida do Ácido Lisérgico
MAJ – Componente Majoritário
MAO-A – Enzima monoamino-oxidase tipo A
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólico
NO₂⁻ - Óxido Nítrico
NOSi – Óxido Nítrico Sintetase Induzida
O₂ - Oxigênio
PBS – Tampão Fosfato Salino
pH – potencial hidrogeniônico
SFB – Soro Fetal Bovino

TA – Análise Térmica

TGA – Análise Termogravimétrica

TH β C – Alcaloide tetra-hidro- β -carbolínico

TMG – Tempo Médio de Germinação

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

UNIANDRADE – Centro Universitário Campos de Andrade

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UV – Ultravioleta

VMG – Velocidade Média de Germinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1 FAMILIA SOLANACEAE.....	23
3.2 GÊNERO <i>Cestrum</i> (Solanaceae).....	24
3.3 <i>Cestrum intermedium</i> Sendtn.....	29
3.4 ALCALOIDES.....	34
3.4.1 Alcaloides Purínicos.....	37
3.4.2 Alcaloides Indólicos.....	38
3.4.2.1 Alcaloides β -Carbolínicos (β Cs).....	40
3.4.3 Alcaloides relacionados à intoxicação animal.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	44
4.1.1 Ensaios Físico-Químicos.....	46
4.1.1.1 Determinação da Perda por Dessecação.....	46
4.1.1.2 Determinação do Teor de Cinzas.....	46
4.1.1.3 Determinação da Densidade Aparente.....	47
4.1.1.4 Análise Termogravimética.....	47
4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	47
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	49
4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	52
4.4.1 Purificação e Isolamento de compostos.....	53
4.4.2 Screening e Identificação de compostos.....	55
4.4.2.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	55
4.4.2.2 Análise por Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	55
4.4.2.3 Análise por Difratometria de Raios-X.....	55
4.4.2.4 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	56
4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	57
4.5.1 Avaliação da Atividade Alelopática.....	57
4.5.1.1 Teste de Germinação.....	58
4.5.1.2 Teste de Crescimento.....	59
4.5.2 Avaliação da Atividade Citotóxica.....	60
4.5.3 Potencial leishmanicida.....	61
4.5.3.1 Toxicidade sobre promatigotas.....	61
4.5.3.2 Toxicidade sobre macrófagos.....	62
4.5.3.3 Produção de óxido nítrico sintetase induzida (NOSi) em macrófagos infectados.....	63

4.5.4 Avaliação da toxicidade em <i>Giardia intestinalis</i>	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	65
5.1.1 Ensaios Físico-Químicos.....	65
5.1.2 Análise Termogravimétrica.....	66
5.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	68
5.2.1 Avaliação macroscópica.....	68
5.2.2 Avaliação microscópica.....	68
5.2.2.1 Folhas de <i>Cestrum intermedium</i>	68
5.2.2.2 Caules de <i>Cestrum intermedium</i>	71
5.2.3 Testes Histoquímicos.....	75
5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	77
5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	79
5.4.1 Amostra PPTEBC1 – Nitrato de Potássio.....	80
5.4.2 Amostra PPTEBC2 - Carbonato de Sódio dihidratado.....	81
5.4.3 Amostra AEF100 – Alantoína.....	82
5.4.4 Amostra AEC140 – Alantoína.....	85
5.4.5 <i>Screening</i> fitoquímico dos extratos de folhas e cascas	86
5.4.6 Perfil cromatográfico do Componente Majoritário (MAJ).....	88
5.4.6.1 Identificação do Componente Majoritário (MAJ).....	89
5.4.7 Amostra CF150.....	96
5.4.8 Amostras CF100-103, CF106-107 e CF108-112.....	102
5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	107
5.5.1 Avaliação da atividade alelopática.....	107
5.5.1.1 Avaliação da Atividade Alelopática em <i>Lactuca sativa</i>	107
5.5.1.1.1 Ensaio de Germinação.....	107
5.5.1.1.2 Teste de crescimento.....	113
5.5.1.1.2.1 Interferência em radículas.....	114
5.5.1.1.2.2 Interferência em hipocótilos.....	115
5.5.1.2 Avaliação da Atividade Alelopática em <i>Allium cepa</i>	117
5.5.1.2.1 Ensaio de Germinação.....	117
5.5.1.2.2 Teste de Crescimento.....	123
5.5.1.2.2.1 Interferência em radículas.....	123
5.5.1.2.2.2 Interferência em hipocótilos.....	124
5.5.2 Avaliação da atividade citotóxica em linhagens tumorais.....	126
5.5.3 Avaliação do potencial leishmanicida.....	127
5.5.3.1 Toxicidade sobre promastigotas e macrófagos.....	128
5.5.3.2 Produção de Óxido Nítrico Sintetase Induzida (NOSi) em macrófagos infectados.....	129
5.5.4 Avaliação da toxicidade em <i>Giardia intestinalis</i>	131
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133

REFERÊNCIAS.....135

1 INTRODUÇÃO

Devido à dimensão continental, o Brasil é composto por diferentes ecossistemas e biomas, dispondo da maior diversidade biológica do planeta (STEHMANN; SOBRAL, 2017; BRASIL, 2014). Estudos focados em espécies nativas são primordiais por valorizarem a biodiversidade local e contribuírem para caracterização da vegetação e seus compostos químicos presentes na flora nacional. Neste contexto, espécies vegetais possuem capacidade de induzir efeitos biológicos, ocasionalmente relacionados a quadros de intoxicação, como observado em diversos gêneros de Solanaceae (SCHVARTSMAN, 2004).

Atividades biológicas geram interesse científico acerca do desenvolvimento de produtos capazes de controlar situações desfavoráveis: pragas em lavouras, proliferação descontrolada de células atípicas ou infecções resistentes. Informações sobre as substâncias responsáveis por estas atividades podem evidenciar padrões quimiotaxonômicos característicos, inclusive padrões de toxicidade (SANTOS, 2010; KINGSBURY, 1979). A quimiotaxonomia é uma forma de classificação focada nos componentes químicos restritamente distribuídos em determinadas espécies, abrindo caminho para a descoberta de novos fármacos de origem natural: utilizados sem alterações estruturais ou como modelo para síntese de novas substâncias bioativas (VON POSER, 2017). Além do potencial farmacológico, o interesse em plantas tóxicas reside nos danos potenciais a seres humanos e animais, resultando em prejuízos significativos a setores de grande impacto econômico, como saúde pública e pecuária.

As pesquisas podem ser pautadas no comportamento animal em relação às plantas (COSTA-NETO, 2012): o consumo de plantas tóxicas pode ocorrer devido à palatabilidade agradável ou em situações de restrição alimentar e hídrica, que interferem no senso de paladar (HARAGUCHI, 2003). Avaliações de toxicidade dependem de experimentos em animais, que nem sempre mimetizam a atividade em humanos (SCHENKEL et al., 2002), além de o grau de intoxicação ocasionado por espécies vegetais variar de acordo com fatores como o seu estágio de desenvolvimento, sazonalidade (clima, regime hídrico, intensidade solar), tipo de solo e fertilização (HARAGUCHI, 2003).

Tendo em vista os fatores percorridos, a espécie vegetal nativa do Brasil *Cestrum intermedium* desperta interesse científico devido aos relatos de intoxicação animal em Furlan et al. (2008), Bandarra et al. (2009) e Wouters et al. (2013): a

ingestão de suas folhas desencadeia quadro hepatotóxico em bovinos, muitas vezes levando os animais a óbito, o que exalta a relevância da identificação dos metabólitos envolvidos neste processo. Vale ressaltar que o Brasil é segundo maior produtor de gado para corte no mundo, sendo que sua taxa de exportação é crescente (WAMBUGO, 2018; USDA, 2019). Em maioria, a criação de gado brasileira é extensiva, consistindo em grandes áreas de pasto para alimentação em livre demanda. Desta forma, o animal alcança facilmente as plantas que o rodeiam, colocando *Cestrum intermedium* em evidência devido ao potencial prejuízo socioeconômico e à saúde animal.

Pertencente a uma família caracteristicamente rica em substâncias bioativas (Solanaceae), não foram encontrados estudos fitoquímicos e biológicos desta espécie vegetal prévios a Szabo (2014a), Szabo (2014b) e Szabo (2015). Até então, a maioria da literatura focava-se na descrição do quadro tóxico observado em gado, analisando o prejuízo à saúde animal. Devido ao histórico de toxicidade amplamente descrito e os avanços no estudo de metabólitos secundários e atividades biológicas da espécie, fica clara a importância do aprofundamento na investigação *Cestrum intermedium*. Portanto, este estudo contribuirá para a caracterização da espécie vegetal analisando e investigando sua morfoanatomia, fitoquímica, além de avaliar potenciais atividades biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folhas e cascas da espécie vegetal *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfoanatomia de folhas, pecíolos e caules;
- Realizar ensaios histoquímicos em folhas, pecíolos e caules;
- Determinar parâmetros físico-químicos de folhas e cascas;
- Isolar e identificar constituintes químicos de folhas e cascas;
- Avaliar atividade Alelopática de extratos de folhas e cascas;
- Avaliar citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas de extratos de folhas e cascas;
- Avaliar atividade leishmanicida de extratos de folhas e cascas;
- Avaliar toxicidade de extratos de folhas e cascas em *Giardia intestinalis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Tradicionalmente, a natureza é uma notável fonte de moléculas terapeuticamente úteis (BRANDÃO et al., 2017; BRAGA et al., 2017). A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos inicia-se com a identificação de protótipos moleculares, podendo ser otimizados com emprego da química medicinal (BRAGA et al., 2017). Diversos medicamentos atualmente empregados tem origem natural, por exemplo:

- Origem Vegetal: relaxantes musculares derivados de tubocurarina; antiespasmódicos à base de atropina; analgésicos opiodes como a morfina e derivados (HENRIQUES et al., 2010; BRAGA et al., 2017);
- Origem Animal: anti-hipertensivos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) derivados de peptídeos do veneno de serpente; analgésicos para dores neuropáticas oriundos de moluscos (ziconotídeo) (BRAGA et al., 2017);
- Origem Microbiana: antibióticos beta-lactâmicos derivados da penicilina, oriunda do metabolismo fúngico (BRAGA et al., 2017).

As atividades de origem vegetal supracitadas baseiam-se em alcaloides, metabólitos secundários ocasionalmente associados à toxicidade, sendo importantes marcadores quimiotaxonômicos encontrados na família Solanaceae (KLEIN-JUNIOR; HENRIQUES, 2017).

3.1 FAMÍLIA SOLANACEAE

Sendo uma das maiores e complexas famílias botânicas das Angiospermas, Solanaceae apresenta vasta distribuição geográfica (destacada em amarelo na FIGURA 1) e seu principal centro de diversidade taxonômica localiza-se na América do Sul (MESQUITA, 2016; VENDRUSCOLO, 2009; SILVA; AGRA, 2005). O grau de complexidade desta ampla família é refletido na diversidade de seus exemplares, divididos entre volumosos gêneros, tais como: *Solanum* (batata, berinjela e tomate); *Nicotiana* (tabaco); *Atropa* (beladona); *Cestrum* (dama-da-noite, mata-boi e outras coeranas) (JOLY, 1985; SILVA; AGRA, 2005; VAZ, 2008; LORENZI; MATOS, 2008).

Há exemplares utilizados como ornamento doméstico e de vias urbanas, como importantes fontes alimentares, em uso terapêutico popular, como origem para obtenção e modelo de moléculas para medicamentos, causadores de intoxicações

acidentais e intencionais, controles de pragas e reflorestamentos (JOLY, 1985; GRANDI et al., 1989; PASTORE et al., 2002; SILVA; AGRA, 2005; VAZ, 2008; LORENZI; MATOS, 2008; SZABO, 2015).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA SOLANACEAE



FONTE: TROPICOS (2020a).

Amplamente relatada em literatura, a toxicidade das solanáceas é atribuída principalmente aos seus alcaloides (SILVA; AGRA, 2005; VENDRUSCOLO, 2009; HENRIQUES et al., 2010; SZABO, 2015), sobressaindo-se nos gêneros *Datura*, *Cestrum* e *Solanum* (SCHVARTSMAN, 2004). Frequentemente são encontrados em espécies de Solanaceae os alcaloides do tipo tropano, pirrol, piridínico e esteroidais (VAZ, 2008). Os graus de toxicidade são variados: exemplares da família são capazes de produzir efeitos irritantes, distúrbios cutâneos e, por vezes, sistêmicos (SCHVARTSMAN, 2004). Apesar da forte relação às propriedades tóxicas, alcaloides apresentam potenciais biológicos que incluem efeitos analgésicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, além de potencial antineoplásico, amplamente investigados (DEY et al., 2019).

3.2 GÊNERO *Cestrum* (Solanaceae)

O gênero *Cestrum* é tipicamente americano e está difundido em zonas tropicais e subtropicais (destaque em amarelo na FIGURA 2), sendo composto por cerca de 250 espécies. Aproximadamente 28 destas são encontradas no Brasil, onde

a maior diversidade endêmica ocorre nos biomas ameaçados por desmatamento: Mata Atlântica e Cerrado (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES et al., 2007; SZABO, 2015; REFLORA, 2020a). Trata-se do segundo maior gênero de Solanaceae, sendo composto essencialmente por espécies ornamentais, havendo relatos de uso na medicina popular, além de intoxicações acidentais (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES et al., 2007). Ainda assim, devido aos escassos estudos e levantamento pouco aprofundado das espécies brasileiras, a identidade e propriedades de muitas delas não foram descritas (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES et al., 2007).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Cestrum*



FONTE: TROPICOS (2020b).

No Brasil, os membros de *Cestrum* são popularmente denominados como coeranas, nome vulgar originário do *tupi-guarani* devido à semelhança de seus frutos a bagas de pimenta (*cui* = pimenta; *rana* = semelhante) (LORENZI; SOUZA, 2008). As coeranas são comumente empregadas em jardins urbanos e no ornamento de vias públicas, especialmente *Cestrum diurnum*, *Cestrum nocturnum*, *Cestrum corymbosum* (RODRIGUES; GUEDES, 2006; LORENZI; SOUZA, 2008).

A taxonomia de *Cestrum* é complexa, apresentando semelhanças morfológicas interespecíes, assim como ao gênero *Sessea*: porte arbustivo/arbóreo, flores articuladas na base, corola tubulosa e cinco estames inclusos no tubo, nectário anelar, anteras dorsifixas e frutos paucisseminados (SOARES, 2006). São diferenciados por características dos frutos e sementes: em *Cestrum* são não aladas,

angulosas e alojadas em baga carnosa, enquanto em *Sessea* são aladas, compridas e alojadas em cápsulas lenhosas (SOARES, 2006). Pertencentes à subfamília Cestroideae, *Sessea* e *Cestrum* fazem parte da tribo Cestreae, juntamente a *Vestia*, gênero ausente no Brasil (SOARES, 2006).

A classificação taxonômica por base filogenética de Cronquist (1981) para o gênero *Cestrum* (QUADRO 1) é amplamente relatada em literatura, enquanto APG III (Angiosperm Phylogeny Group), empregando o sequenciamento de DNA, apresenta a classificação taxonômica mais atual (QUADRO 2).

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA FILOGENÉTICA DE *Cestrum* BASEADA EM CRONQUIST (1981)

REINO	Plantae
FILO	Tracheophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Solanales
FAMÍLIA	Solanaceae
GÊNERO	<i>Cestrum</i>

FONTE: Stehmann et al. (2009); The Plant List (2020).

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *Cestrum* BASEADA EM SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

CLASSE	Equisetopsida C. Agardh
SUBCLASSE	Magnoliidae Novák ex Takht.
SUPERORDEM	Astereranae Takht.
ORDEM	Solanales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
FAMÍLIA	Solanaceae Juss.
GÊNERO	<i>Cestrum</i> L.

FONTE: TROPICOS (2020c).

Dentre as espécies mais conhecidas estão a Dama-da-noite (*Cestrum nocturnum*) e Jasmin-diurno (*Cestrum diurnum*), sendo as primeiras descritas por Linnaeus (SOARES, 2006), além de amplamente investigadas quimicamente e por suas atividades biológicas. O óleo essencial destas espécies é utilizado como repelente do mosquito da malária em regiões africanas (AL-REZA et al., 2010), sendo o óleo essencial de *C. diurnum* reportado por forte atividade antibacteriana *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (BHATTACHARJEE et al., 2005). As folhas de *C. nocturnum* são utilizadas de forma recreativa analogamente à maconha, apesar de seus afeitos alucinógenos não estarem comprovados, estão possivelmente associados ao seu alto teor alcaloídico (45% de nicotina nas folhas) (CUARTAS; CASTAÑO, 2008), além de apresentar indícios de ação farmacológica

para síndromes neurológicas devido à atividade analgésica, sedativa e antiepiléptica (GALLEGO, 2011).

Há espécies do gênero conhecidas pela toxicidade provocada em animais de importância econômica: em determinadas regiões do país, exemplares de *Cestrum* são considerados as plantas tóxicas de maior importância devido às ocorrências de intoxicações em rebanhos bovinos, muitas vezes acarretando em óbito dos animais (KISSMAN; GROTH, 2000; SOARES, 2006; SOARES et al., 2007; ROSSETI; CORSI, 2009).

Cestrum sendtnarium ocasiona um quadro de intoxicação em gado bovino, caracterizado por processo diarreico, relacionado à presença de saponinas (AFONSO; SANTOS, 1995). *Cestrum laevigatum* (sinônimo de *Cestrum axillare*), uma das espécies mais comumente encontradas em campo (VIGNOLI-SILVA, 2009), além de apresentar moderada atividade antimalárica *in vitro* (MADUREIRA et al., 2002), emoliente (RODRIGUES; GUEDES, 2006) e ser utilizada em rituais religiosos, ocasiona intoxicação ao gado bovino, caprino, ovino e bubalinos podendo levar os animais a óbito (SOARES, 2006; MARINHO et al., 2018), induzindo quadro tóxico diferenciado de *C. sendtnarium*.

Apesar da toxicidade reportada para membros do gênero, muitas espécies são empregadas terapeuticamente em uso popular, inclusive aquelas que apresentam eventos tóxicos relacionados a elas, como *Cestrum laevigatum* e *Cestrum sendtnarium* (SZABO, 2015). O QUADRO 3 apresenta um compilado das espécies de *Cestrum* com uso popular citado em literatura, além de listar seus principais metabólitos secundários reportados.

QUADRO 3 – ATIVIDADES E METABÓLITOS RELATADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Cestrum*

ESPÉCIE	ATIVIDADES	METABÓLITOS	REFERÊNCIAS
<i>C. laevigatum</i> (Sinônimo de <i>C. axillare</i>)	Abortiva; Diurética; Antiúlcera; Emoliente; Antiespasmódica; Antimalárica; Anti-inflamatória; Contra problemas oftalmológicos; Toxicidade similar à <i>C. intermedium</i> .	Triterpenos (lupeol) Esteroides Saponinas (cestrumida, digitogenina e gitogenina)	BORGES et al., 1986; GALLO, 1979; apud AFONSO; SANTOS, 1995; MADUREIRA et al., 2002; SILVA et al., 2003; HARAGUCHI, 2003; RODRIGUES; GUEDES, 2006; BEGUM, GOYAL, 2007; ROSSETI; CORSI, 2009; SILVA, 2009.
<i>C. diurnum</i>	Repelente; Larvicida; Antimalárica; Antibacteriana; Toxicidade por vitamina D ao gado.	Óleo essencial; Alcaloides (nicotina, normicotina) Terpenoides (ácido ursólico) Saponinas (tigogenina) Vitamina D; Taninos	BAQAI, 1999; BHATTACHARJEE et al., 2005; BEGUM, GOYAL, 2007 AL-REZA et al., 2010; PRASAD et al., 2013.
<i>C. nocturnum</i>	Febrífuga; Antibacteriana; Antidiarreica; Anti-inflamatória; Analgésica; Antimalárica; Antiepilética; Sedativa.	Alcaloides (nicotina, normicotina, cotinina, miosmine, atropina, escopolamina, hiosciamina) Saponinas (digitogenina, gitogenina, digalogenina, yucagenina) Glicosídeos esteroidais; Flavonoides glicosilados	GRANDI et al., 1989; BEGUM, GOYAL, 2007 CUARTAS; CASTAÑO, 2008; AL-REZA et al., 2010; GHENO-HEREDIA et al., 2011; GALLEGO, 2011.
<i>C. parqui</i> ; <i>C. calycinum</i>	Antidiarreica; Antipirética; Moléstias cutâneas; Reumatismo; Anti-inflamatória; Emoliente; Sedativa; Antiespasmódica.	Triterpenos (ácido ursólico) Flavonoides (quercitina) Lignanas (Sesquilignanas; Neolignanas; Norlignanas) Saponinas (digitogenina, gitogenina, digalogenina) Alcaloides: parquine	MENTZ et al., 1997; D'ABROSCA et al., 2005; BEGUM, GOYAL, 2007 FIORENTINO et al., 2007.
<i>C. amictum</i> ; <i>C. pseudoquina</i> (Sinônimo de <i>C. euanthes</i>);	Febrífuga; Adstringente; Anti-hemorroida.	Compostos fenólicos (ácido cestreico)	MENTZ et al., 1997; BEGUM, GOYAL, 2007.
<i>C. sendtnerianum</i>	Toxicidade distinta à <i>C. intermedium</i>	Saponinas esteroidais FONTE: A autora (2020).	AFONSO; SANTOS, 1995; TURNOCK et al., 2001.

3.3 *Cestrum intermedium* Sendtn.

Popularmente conhecida como mata-boi, peloteira-preta e erva-de-tinta, *Cestrum intermedium* Sendtn. (FIGURA 3) é uma coarana nativa do Brasil, de porte arbustivo, podendo atingir porte arbóreo (KISSMANN; GROTH, 2000; SOARES et al., 2007), alcançando até quinze metros de altura (SOARES, 2006). Este membro pouco investigado de *Cestrum* foi descrito e nomeado por Otto Sendtner (Sendtn.) (TROPICOS, 2020c). A etimologia do epíteto *intermedium* faz alusão ao espaço ocupado entre *C. parqui* e *C. cuspidatum*, sendo considerada espécie intermediária entre estas (VIGNOLI-SILVA, 2009).

FIGURA 3 – EXSICATA DE *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020), disponível em REFLORA (2020b).

É encontrada em matas e locais antropizados em toda a Região Sul, Sudeste (Estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Nordeste (Estado da Bahia) do país, como ilustrado na FIGURA 4 (SOARES et al., 2007; STEHMANN et al., 2014).

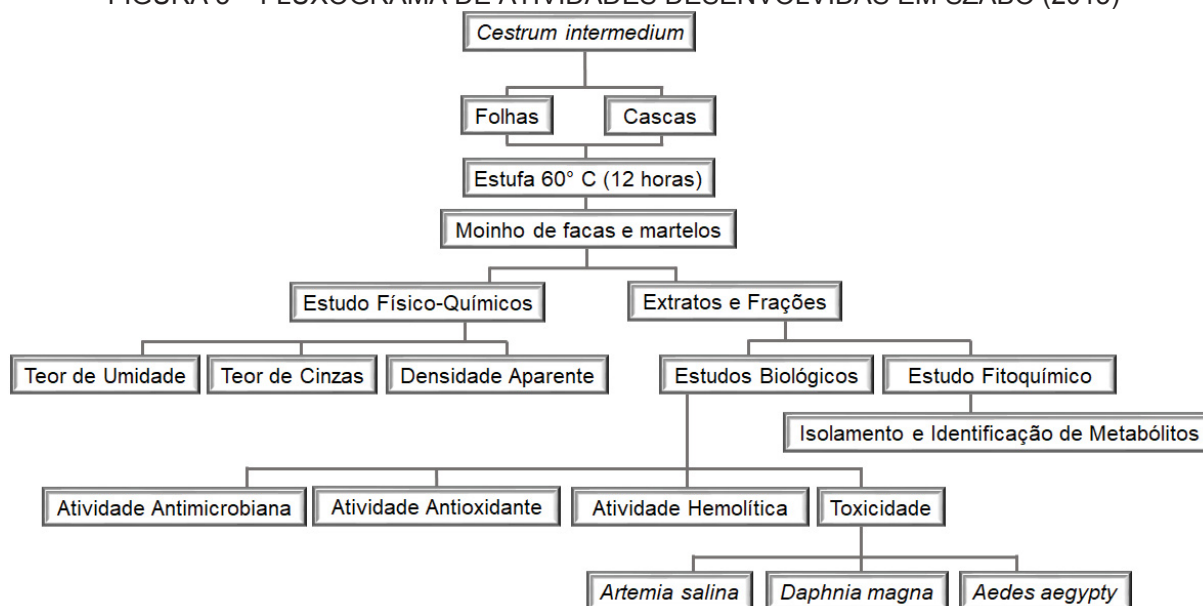
FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DE *Cestrum intermedium* NO TERRITÓRIO BRASILEIRO

FONTE: Szabo (2015) adaptado de STEHMANN et al. (2014).

Cestrum intermedium está relacionada à intoxicação em rebanhos de gado bovino: os animais que ingerem seus ramos desenvolvem sintomas como anorexia, tremores, dificuldade de locomoção, secura do focinho, salivação abundante, apresentando fezes secas com muco e sangue ou fezes escuras e pastosas, e ocasionalmente, morte (RIET-CORREA et al., 1993; KISSMAN; GROTH, 2000; FURLAN et al., 2008; BANDARRA et al., 2009; ROSSETI; CORSI, 2009; WOUTERS et al., 2013). Insuficiência hepática aguda, ocasionada por doses únicas (25 g/Kg), foi observada durante necrópsia, porém as substâncias responsáveis não foram identificadas (FURLAN et al., 2008; BANDARRA et al., 2009; WOUTERS et al., 2013). Sintomas similares são observados em animais que ingerem *Cestrum laevigatum*, sendo sua toxicidade relacionada às saponinas presentes na espécie: cestrumida, gitogenina e digitogenina (GALLO, 1979 apud AFONSO; SANTOS, 1995; HARAGUCHI, 2003; ROSSETTI, CORSI, 2009).

A espécie em questão foi objeto de estudo da dissertação intitulada “Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae)” (SZABO, 2015), sendo as atividades realizadas apresentadas no fluxograma (FIGURA 5) e os resultados apresentados na sequência. Anteriormente, a literatura acerca de *Cestrum intermedium* limitava-se a breves relatos botânicos (foco amplo no gênero) e toxicológicos (focando no quadro clínico animal, sem aprofundar-se na espécie vegetal).

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM SZABO (2015)



FONTE: A autora (2020).

Em Szabo (2015), o ensaio sistemático fitoquímico preliminar, realizado em folhas e cascas de *Cestrum intermedium*, indicou a presença de marcadores quimiotaxonômicos da família Solanaceae e gênero *Cestrum*: alcaloides e heterosídeos saponínicos, dentre outras classes de metabólitos como flavonoides e terpenoides (QUADRO 4). Como previamente exposto, alcaloides e saponinas são marcadores taxonômicos relacionados à toxicidade (GALLO, 1979 apud AFONSO; SANTOS, 1995; HARAGUCHI, 2003; ROSSETTI, CORSI, 2009).

QUADRO 4 – METABÓLITOS PRESENTES EM FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*

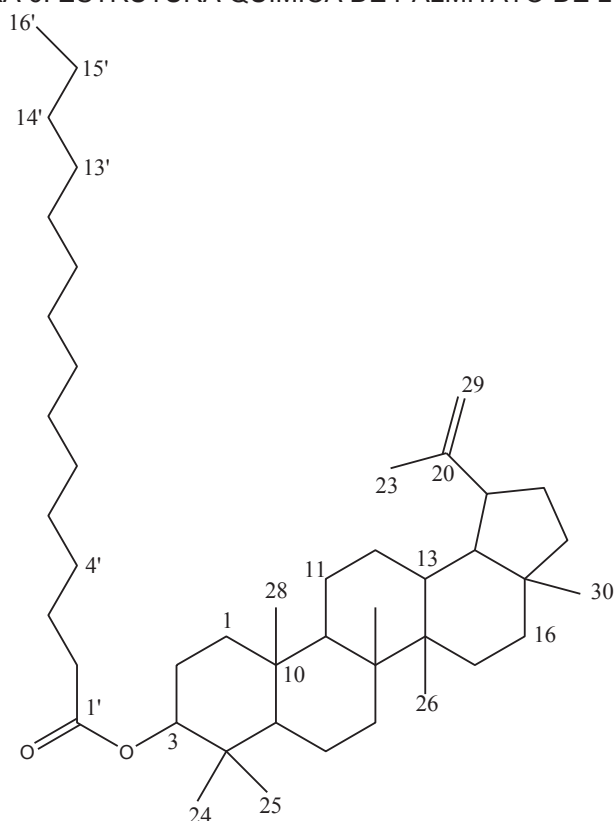
ANÁLISES		MATERIAL VEGETAL	
Classe de metabólito	Reagente	Folhas	Cascas
Alcaloides	Meyer	+	+
	Dragendorff	+	+
	Bouchardat	+	+
	Bertrand	+	+
Flavonoides	Heterosídeos flavônicos	+	+
	Flavonois	+	+
Cumarinas	N/A	-	+
Esteroides/Triterpenos	Keller – Kelliani	+	+
Heterosídeos Saponínicos	N/A	+	+

FONTE: Adaptado de Szabo (2015).

Legenda: N/A (Não se aplica); + (Presença); - (Ausência).

A partir de extrato das cascas, Szabo (2015) identificou o composto palmitato de lupeol (FIGURA 6), triterpeno ligado a um ácido graxo de cadeia longa, derivado do triterpenoide pentacíclico denominado lupeol. O lupeol foi identificado pela primeira vez no gênero *Cestrum* no estudo fitoquímico de Silva (2009) em *C. laevigatum*. Assim como o lupeol e seus outros derivados, o palmitato de lupeol possui atividade anti-inflamatória, sendo utilizado no tratamento de artrite reumatoide (HODGES et al., 2003; CHAKRABORTY; RANGARI, 2011). Além desta, diversas atividades farmacológicas *in vivo* e *in vitro* tem sido reportadas, tais como atividades contra câncer (pele, próstata, mama, colon), diabetes, doenças cardíacas, toxicidade hepática e renal (SILVA et al., 2017; SALEEM, 2009).

FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DE PALMITATO DE LUPEOL



FONTE: Szabo (2015).

O palmitato de lupeol apresentou atividade citostática *in vitro* em células de adenocarcinoma colorretal (ATCC HT-29) e leucemia mielógena crônica (ATCC K-562), além de inibição seletiva de crescimento dose-dependente em células de leucemia eritromieloblastoide crônica (ATCC K-562) em Silva et al. (2017). Não há dados em literatura que permitam a associação do palmitato de lupeol à atividade tóxica observada em gado bovino.

Os ensaios biológicos preliminares abriram caminho para investigação de atividades como citotoxicidade, aplicações clínicas, cosméticas, ambientais, as quais devem ser investigadas, assim como auxiliaram o direcionamento da investigação de metabólitos secundários. Os resultados obtidos em Szabo (2015) refletem o perfil de toxicidade da espécie, além de outras atividades biológicas *in vitro*, sendo os resultados apresentados resumidamente no QUADRO 5.

QUADRO 5 – ENSAIOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES REALIZADOS EM *Cestrum intermedium* por SZABO (2015)

Amostra		Ensaio Biológico							
		<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>				
		<i>Artemia salina</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Hemólise	Antimicrobiano (CIM) (µg/mL)	Doseamento de polifenóis [fenóis totais]	Redução de Fosfomolibdênio AAR (%): Rutina	Redução de DPPH
Folhas	EB	NT	NT	Larvas não evoluem ao estágio de mosquito	<40%	≤100	Média-alta	34,73	Inativa
	H					250 ≤ CIM ≤1000	-	20,12	
	C	Tóxica	Tóxica		<30%	500 ≤ CIM ≤1000	Alta	60,45	
	AE	Tóxica	Tóxica		<57%	1000		23,01	Ativa
	R	NT	NT		<85%	> 1000	Média-alta	15,92	Inativa
Casca	EB		Tóxica		0%	> 1000		38,16	
	H		Tóxica		<30%	500 ≤ CIM ≤1000	-	83,11	
	C	Tóxica	Tóxica			1000	Alta	82,33	Ativa
	AE	Tóxica	Tóxica		≅0%	> 1000		23,88	Ativa
	R	NT	NT		≅0%	> 1000	Média-alta	30,62	Inativa

FONTES: A autora (2020).

NOTA: EB – Extrato Bruto; H – Fração Hexano; C – Fração Clorofórmio; AE – Fração Acetato de Etila; R – Fração Remanescente; NT – Não tóxica; CIM – Concentração Inibitória Mínima; AAR – Atividade Antioxidante Relativa; DPPH - 2,2-difenil-1-picrihidrazila.

Diversas substâncias apresentam potencial tóxico de ação, podendo interferir em sistemas enzimáticos, no DNA, transporte de elétrons, compartimentos celulares e até gerar formações celulares. Pode-se mensurar os efeitos de substâncias tóxicas em organismos a partir de bioensaios (KNIE; LOPES, 2004). Dentre os referidos ensaios biológicos, a investigação de atividade tóxica *in vivo* empregou como organismos-teste os microcrustáceos *Artemia salina* (água salina/salobra) e *Daphnia magna* (água doce), além de larvas de *Aedes aegypti*, um importante vetor de doenças virais como dengue, chikungunya e zika.

O bioensaio em *Artemia salina* consiste em experimento largamente aplicado na investigação de fontes de toxicidade em amostras ambientais e misturas químicas, detecção de toxinas naturais em alimentos e produtos farmacêuticos, além de parâmetros de citotoxicidade (MEYER et al., 1982; PERSOONE; WELLS, 1987).

Desde a introdução por Meyer et al. (1982), este método vem sendo utilizado na avaliação de agentes antitumorais ativos *in vivo* e pesticidas produzidos por plantas (GHISALBERTI, 2008). Obtém-se uma boa correlação entre o bioensaio em *Artemia salina* e os testes em culturas celulares tumorais, além de atividade antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasitocida e tripanossomicida (SIQUEIRA *et al.*, 1998). Portanto, avaliando o efeito de *Cestrum intermedium* neste organismo, foi possível obter panorama de toxicidade, norteando perspectivas dos futuros ensaios toxicológicos.

Em destaque nos ensaios biológicos de toxicidade, as frações Acetato de Etila e Clorofórmio de folhas e cascas de *Cestrum intermedium* demonstraram toxicidade moderada a alta aos microcrustáceos, especialmente a fração Acetato de Etila das Cascas. Em larvas de *Aedes aegypti*, apesar de não ser observada letalidade dos organismos-teste, todas as amostras ocasionaram alterações morfoanatômicas incompatíveis com a evolução ao estágio de mosquito.

As atividades *in vitro* não subentendem atividades *in vivo*, sendo necessária investigação aprofundada após avaliação toxicológica em organismos superiores: as atividades antioxidante (relacionada ao teor de compostos fenólicos), antimicrobiana (inibição fraca a moderada em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*) e hemolítica (indicadora de toxicidade) são dados preliminares sobre o perfil de *Cestrum intermedium*, assim como os bioensaios nos microcrustáceos e *Aedes aegypti*.

3.4 ALCALOIDES

Como brevemente discorrido, os alcaloides são metabólitos secundários, muitas vezes considerados marcadores taxonômicos, intimamente relacionados à toxicidade de diversas espécies. A literatura reporta sua distribuição em diversos organismos: animais, fungos, bactérias, seres marinhos e, especialmente, em plantas superiores como as Angiospermas (HENRIQUES *et al.*, 2010; GOYAL, 2013; KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017). São encontrados principalmente nas famílias Amaryllidaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Lauraceae, Liliaceae, Loganinaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae e

Solanaceae (KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017), apresentando distribuição mais restrita quando comparados a outros metabólitos secundários (GOYAL, 2013).

Trata-se de um grupo químico de grande impacto socio-econômico, havendo registros do emprego de plantas contendo alcaloides há mais de 4000 anos (HENRIQUES et al., 2010). Seu uso está relacionado não apenas a fins terapêuticos, havendo relatos associando estes metabólitos à execuções (coniina, atropina, estricnina, colchicina devido a seus efeitos tóxicos) e a rituais indígenas (efedrina, psilocina e psilocibina por seus efeitos psicotrópicos) (HENRIQUES et al., 2010; KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017). As folhas de tabaco, ricas em nicotina, foram um dos primeiros inseticidas já empregados, enquanto a cafeína tem sido considerada uma alternativa segura para manejo de pestes (LORENZI; MATOS, 2008; GOYAL, 2013).

Os alcaloides apresentam grande variedade estrutural, o que torna desafiador descrevê-los quimicamente (SANTOS, 2010). A definição de Pelletier é clássica e ampla suficiente para contemplar sua diversidade química, descrevendo um alcaloide como composto orgânico cíclico contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo que apresenta distribuição limitada entre seres vivos (SANTOS, 2010). Muitos apresentam atividade óptica, sendo o grupo de produtos naturais mais estudado, especialmente com foco terapêutico (HENRIQUES et al., 2010; KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017).

A biossíntese alcaloídica demanda alta energia, o que é considerado indicativo de apresentar função fisiológica, não se tratando apenas de resíduo do metabolismo primário (KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017). Em plantas, frequentemente formam sais com ácidos (ex.: ácido quínico), alguns se combinam com açúcares (ex.: solanina) e outros ocorrem como ésteres ou amidas (ex.: paclitaxel) (HENRIQUES et al., 2010). Devido à diversidade entre estruturas, a classificação dos alcaloides busca acomodar esta enorme variedade (milhares de estruturas isoladas apenas em plantas) com base nas unidades precursoras e as vias de biossíntese e, de maneira resumida, podem ser classificados como (KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017):

- Alcaloides verdadeiros: derivados de aminoácidos, possuindo nitrogênio em heterociclo.
- Protoalcaloides: derivados de aminoácidos, possuindo nitrogênio fora do heterociclo.

Como pode-se observar na FIGURA 7, a partir do ácido chiquímico são originados os aminoácidos aromáticos (precursores de diversos tipos de alcaloides) em plantas, fungos e bactérias, porém não em animais, o que classifica aminoácidos como triptofano e fenilalanina como nutrientes essenciais (SANTOS, 2010). Ainda, um mesmo precursor pode dar origem a diferentes subclasses, por exemplo o triptofano: originando as classes indol, β -carbolina e pirroloindol (KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017).

```
graph TD
    GLICOSE{{GLICOSE}} --> Polissacarídeos
    GLICOSE --> Heterosídeos
    GLICOSE --> AC
    AC --> ACh[Ácido Chiquímico]
    AC --> AcCoA[Acetil-CoA]
    ACh --> Triptofano
    ACh --> Fenilalanina_Tirosina[Fenilalanina/Tirosina]
    ACh --> Acido_Gálico[Ácido Gálico]
    Triptofano --> Alcaloides_Indólicos[Alcaloides Indólicos]
    Triptofano --> Alcaloides_Quinolínicos[Alcaloides Quinolínicos]
    Fenilalanina_Tirosina --> Protoalcaloides[Protoalcaloides]
    Fenilalanina_Tirosina --> Alcaloides_Isoquinolínicos[Alcaloides Isoquinolínicos]
    Fenilalanina_Tirosina --> Alcaloides_Benzilisoquinolínicos[Alcaloides Benzilisoquinolínicos]
    Fenilalanina_Tirosina --> Acido_Cinâmico[Ácido Cinâmico]
    Acido_Cinâmico --> Fenilpropanoides[Fenilpropanoides]
    Fenilpropanoides --> Lignanas_Ligninas[Lignanas e Ligninas]
    Fenilpropanoides --> Cumarinas
    Acido_Gálico --> Taninos_Hidrolisáveis[Taninos Hidrolisáveis]
    AC --> Antraquinonas
    AC --> Flavonoides
    AC --> Taninos_Condensados[Taninos Condensados]
    AcCoA --> Ciclo_Acido_Citrico((Ciclo do Ácido Cítrico))
    Ciclo_Acido_Citrico --> Ornitina_Lisina[Ornitina Lisina]
    Ornitina_Lisina --> Alcaloides_Pirrolidínicos[Alcaloides Pirrolidínicos]
    Ornitina_Lisina --> Alcaloides_Tropânicos[Alcaloides Tropânicos]
    Ornitina_Lisina --> Alcaloides_Pirrolizidínicos[Alcaloides Pirrolizidínicos]
    Ornitina_Lisina --> Alcaloides_Piperidínicos[Alcaloides Piperidínicos]
    Ornitina_Lisina --> Alcaloides_Quinolizidínicos[Alcaloides Quinolizidínicos]
    AcCoA --> Via_Mevalonato[Via Mevalonato]
    Via_Mevalonato --> Isoprenoides
    Isoprenoides --> Terpenoides
    Isoprenoides --> Esteroides
    AcCoA --> Condensação
    Condensação --> Acidos_Graxos[Ácidos Graxos]
    Condensação --> Acetogeninas
```

O diagrama ilustra a síntese de metabólitos secundários a partir de GLICOSE e Acetil-CoA. A GLICOSE pode ser convertida em Polissacarídeos, Heterosídeos ou entrar no ciclo de síntese de Ácido Chiquímico e Acetil-CoA. O Ácido Chiquímico é precursor de Triptofano (que leva a Alcaloides Indólicos e Alcaloides Quinolínicos), Fenilalanina/Tirosina (que leva a Protoalcaloides, Alcaloides Isoquinolínicos, Alcaloides Benzilisoquinolínicos e Ácido Cinâmico) e Ácido Gálico (que leva a Taninos Hidrolisáveis). O Ácido Cinâmico é precursor de Fenilpropanoides, que leva a Lignanas e Ligninas e Cumarinas. O Acetil-CoA é precursor de Antraquinonas, Flavonoides, Taninos Condensados, do Ciclo do Ácido Cítrico (que leva a Ornitina Lisina, precursora de Alcaloides Pirrolidínicos, Tropânicos, Pirrolizidínicos, Piperidínicos e Quinolizidínicos), da Via Mevalonato (que leva a Isoprenoides, Terpenoides e Esteroides) e da Condensação (que leva a Ácidos Graxos e Acetogeninas).

FONTE: Adaptado de Santos (2010).

A maioria dos alcaloides é fisiologicamente ativa, apresentando uma variedade de efeitos tóxicos em fungos, bactérias e animais (que ocasionalmente desenvolvem mecanismos de defesa), além de efeitos alelopáticos em plantas (tornando-as mais competitivas em relação às vizinhas), propriedade comum às solanáceas (GOYAL, 2013). Pode-se citar como funções dos alcaloides nas espécies vegetais que os sintetizam: armazenamento e transporte de nitrogênio, proteção

contra radiação UV (principalmente os alcaloides aromáticos, como os indólicos) e defesa contra herbivoria, devido ao seu gosto amargo e suas propriedades tóxicas (HENRIQUES et al., 2010; KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017). Esta propriedade é útil como defesa contra herbívoros, mas também para o próprio predador, afastando-o do contato com substâncias potencialmente nocivas. Alguns exploram esta utilidade com maestria, “sequestrando” alcaloides e os utilizando em sua própria defesa contra outros predadores (GOYAL, 2013).

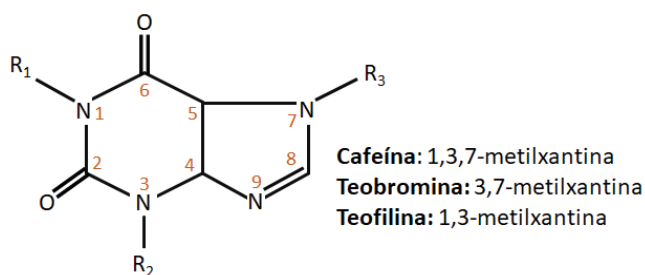
Portanto, as plantas não são hospedeiros passivos, empregando metabólitos secundários na defesa direta (pela toxicidade) ou indireta, por exemplo emitindo compostos voláteis que atraem inimigos tróficos de seus predadores (GOYAL, 2013). Atuando na defesa química, desde fungos a vertebrados, sendo capazes de interagir com diferentes alvos moleculares, os alcaloides modulam comunicações intra e intercelulares, podendo comprometer o metabolismo do predador, acarretando em efeito tóxico.

Dentre os alvos de toxicidade dos alcaloides, pode-se citar receptores celulares dopaminérgicos e adrenérgicos, enzimas colinesterases e monoaminoxidases, sendo estes os mesmos alvos que proporcionam atividades terapêuticas (KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017). Suas propriedades farmacológicas geralmente estão relacionadas à estrutura química molecular, sendo comumente reportadas: atividade análogas de neurotransmissores (regulando funções) e citotoxicidade (vinblastina e vincristina, com atividade anti-neoplásica; berberina e sanguinarina, com atividade antimicrobiana; quinina e derivados, com efeito antiparasitário) (KLEIN JUNIOR; HENRIQUES, 2017).

3.4.1 Alcaloides Purínicos

Devido ao caráter anfótero e origem biossintética alternativa, a partir de bases púricas, as metilxantinas são consideradas pseudoalcaloides (RATES, 2010). No entanto, diversos autores as consideram alcaloides verdadeiros, também chamados de alcaloides purínicos (FIGURA 8) (ASHIHARA et al., 2008), devido a suas atividades biológicas marcantes, presença de nitrogênio heterocíclico e distribuição restrita. Inclusive, para obtenção de extratos com altos teores de metilxantinas, empregam-se os métodos clássicos para extração de alcaloides (RATES, 2017).

FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ALCALOIDES PURÍNICOS



FONTE: Adaptado de Santos (2010).

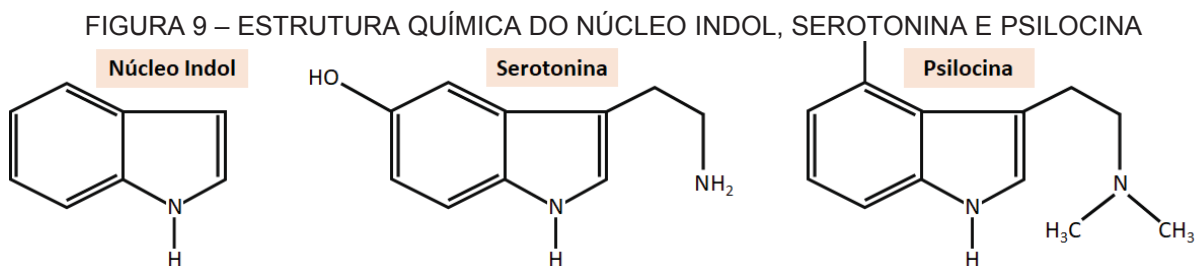
Ocorrem em famílias não relacionadas filogeneticamente, apresentando distribuição restrita às regiões tropicais e subtropicais (RATES, 2010; RATES, 2017), sendo reportadas em pelo menos 80 espécies (LEAN et al., 2011). A biossíntese de metilxantinas dá-se a partir de bases púricas livres (hipoxantina, adenina, guanina e nucleosídeos), sendo a adenina considerada o precursor mais importante. Há relatos em literatura que relacionam os alcaloides purínicos ao metabolismo do nitrogênio e carbono, sendo influenciados diretamente por fatores ambientais, sazonais e estágio de desenvolvimento do vegetal (RATES, 2010; RATES, 2017). Assim como há teorias que os associam à defesa química e função alelopática, como ocorre com a cafeína (ASHIHARA et al., 2008).

São as substâncias farmacologicamente ativas mais consumidas no mundo na forma de alimentos, como café, chá, mate, guaraná, cola e chocolate (cacau) (ASHIHARA et al., 2008; RATES, 2010; LEAN et al., 2011; RATES, 2017), sendo as mais abundantes e populares a cafeína, teofilina e teobromina (RATES, 2010; LEAN et al., 2011; RATES, 2017). Outro importante membro desta classe é a alantoína, citada por apresentar inúmeras atividades, como o estímulo de mitose celular, auxiliando o crescimento de tecido conectivo, ossos, cartilagem, além de acelerar a cicatrização de ferimentos, também apresentando efeitos anti-irritante, hidratante, removedor de tecido necrótico, queratolítico e analgésico (BARBAKADZE et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010), sendo empregada em formulações cosméticas desde meados de 1940 (ARAÚJO et al., 2010).

3.4.2 Alcaloides Indólicos

Compondo um dos grupos mais extensos dentre os alcaloides, com cerca de 4000 representantes, os alcaloides indólicos são sintetizados por organismos

aquáticos e terrestres, sendo comuns entre as famílias vegetais Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae (SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017). Diversas plantas que os incluem dentre seus metabólitos secundários são consideradas tóxicas por apresentarem potente atividade biológica (inerente à classe que contém o núcleo indol), principalmente devido à similaridade estrutural a neurotransmissores (FIGURA 9), agindo sob o sistema nervoso (SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017).



FONTE: Adaptado de Schripsema et al. (2010).

Atuam como agonistas e antagonistas parciais de receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e dopaminérgicos, interagindo com um ou mais receptores, proporcionando grande variedade de atividades biológicas (SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017). Muitas substâncias alucinógenas classificam-se dentre os exemplares: interagindo com receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} a psilocibina (princípio ativo do cogumelo *Psilocybe mexicana*, utilizado na cultura Asteca); *N-N*-dimetiltryptamina (um dos componentes de bebidas ritualísticas como ayahuasca e vinho de Jurema, utilizadas em cerimônias religiosas, até hoje só encontrada no gênero *Physostigma*); dietilamida do ácido lisérgico (LSD, uma notória droga alucinógena, sendo uma das mais potentes substâncias alucinógenas conhecidas) e derivados do harmano (SCHRIPSEMA et al., 2010; SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017). Interagindo complexamente com receptores adrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, os originários de esporão-do-centeio, ioimbina, reserpina e ajmalicina (SCHRIPSEMA et al., 2010; SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017).

Dentre os fármacos originados de alcaloides indólicos, os mais populares são ergotamina (utilizada na prevenção e tratamento de enxaqueca), vincristina e vimblastina (antineoplásicos) e iombina (empregada em distúrbios de fluxo sanguíneo). Busca por novos compostos bioativos nesta classe é contínua, demonstrando avanços além do reino vegetal, abrangendo micro-organismos e invertebrados, o que amplia a variedade estrutural (SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017).

A biossíntese destes alcaloides verdadeiros inicia-se a partir da derivação do aminoácido triptofano: sua descarboxilação origina a triptamina, amplamente distribuída no reino vegetal, fornecendo o sistema indólico. Diretamente relacionada à biogênese, a classificação destes alcaloides é baseada em características estruturais, subdividindo-se entre (SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017):

- Monoterpênicos: compreende a maior subclasse, apresentando grande variedade estrutural, diretamente relacionada à dificuldade de síntese artificial (uso terapêutico emprega exclusivamente fontes naturais). Formados pela condensação da triptamina, o grande grupo dos monoterpênicos pode ser dividido em 11 classes, ramificadas em 46 subclasses, totalizando cerca de 2500 representantes. Compartilham a via biossintética dos alcaloides quinolínicos, como a quinina, originados a partir de modificações do esqueleto indólico básico.

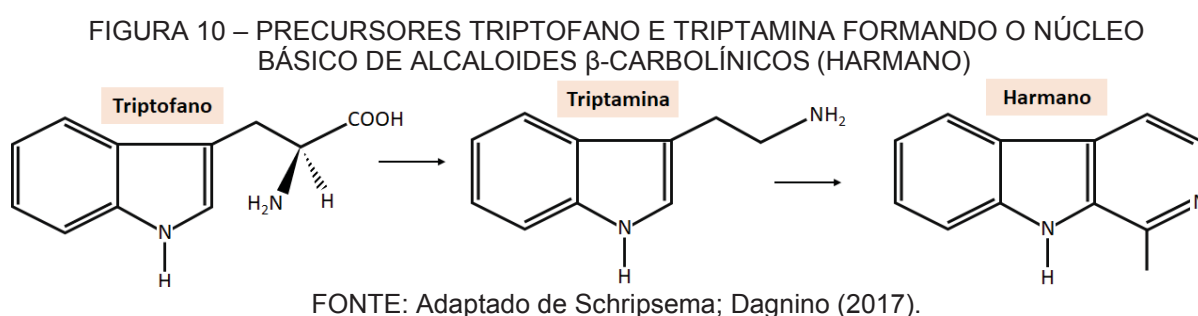
- Hemiterpênicos (ergolinas): sintetizados por determinados fungos (filo Ascomycota, ordem Eurotiales) e poucas espécies vegetais (família Poaceae, Convolvulaceae e Polygalaceae), todas hospedeiras de fungos ascomiotas, os verdadeiros biossintetizadores. Podem ser classificados entre clavininas, amidas do ácido lisérgico e ergopeptídeos, sendo representados por ergotamina, ergometrina e LSD, um derivado semi-sintético do ácido lisérgico.

- β -carbolínicos (β Cs): São considerados os derivados mais simples dos alcaloides indólicos, onde o 3º anel (anel C) está fechado por condensação com formato ou acetato. Por serem encontrados em diversas famílias, sua ocorrência não apresenta significância biossintética. A característica comum entre β Cs é a presença de mais de um anel de seis membros (anel piridínico), sendo conhecidos como alcaloides do tipo harmalo.

3.4.2.1 Alcaloides β -Carbolínicos (β Cs)

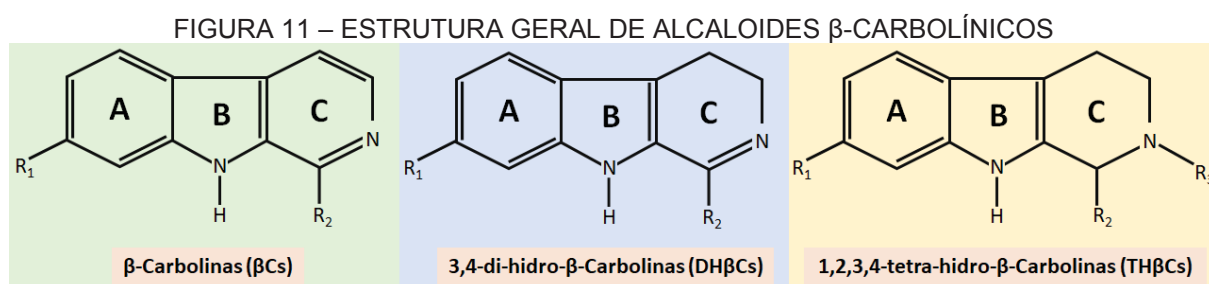
Também denominados por alcaloides de harmala, devido o primeiro isolamento ter ocorrido em sementes de *Peganum harmala*, planta alucinógena utilizada em rituais religiosos, os alcaloides β -carbolínicos (β Cs) são frequentemente reportados, sendo comuns nas famílias Apocynaceae, Chenopodiaceae, Elaeagnaceae, Leguminosae, Loganiaceae, Passifloraceae, Polygonaceae, Rubiaceae, Symplocaceae e Zygophyllaceae, ocorrência não relevante quimiossistematicamente (SCHRIPSEMA et al., 2010).

A presença de β Cs já foi detectada em outras matrizes, como na fumaça de cigarros, alimentos ricos em proteínas aquecidos a temperaturas muito elevadas, bebidas como vinho e saquê, além de fungos e alguns animais, inclusive em mamíferos (apresentando notável diferença estrutural das β Cs vegetais) (WANG et al., 2014). Apresentam núcleo indólico ligado a anel piridínico, formando o esqueleto harmano: durante a biossíntese vegetal dos alcaloides β -carbolínicos, a partir do triptofano, a triptamina é condensada com acetato (SCHRIPSEMA et al., 2010) ou formato (SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017), apresentando um anel adicional de seis membros (anel piridínico) (FIGURA 10).



Alguns β Cs possuem anel aromático piridínico insaturado, outros anel di-hidro ou tetra-hidroaromáticos (SCHRIPSEMA et al., 2010; LAINE et al., 2014; SCHRIPSEMA; DAGNINO, 2017), sendo então classificados de acordo com o grau de saturação do anel piridínico (anel C) (FIGURA 11) (GLENNON et al., 2000; LAINE et al., 2014):

- β -Carbolinas (β Cs): Totalmente aromáticas (anel piridínico totalmente insaturado);
- 3,4-di-hidro- β -carbolinas (DH β Cs): Anel C parcialmente insaturados, também conhecidos como derivados do Harmalano;
- 1,2,3,4-tetra-hidro- β -carbolinas (TH β Cs): Anel C totalmente insaturados.



Derivados do harmano, como harmina e harmalina, são princípios ativos de espécies vegetais utilizadas em rituais indígenas na Amazônia, comumente misturadas à *Psycotria viridis*, que contém *N-N*-dimetiltriptamina (DMT), presente nos rituais de ayahuasca (SCHRIPSEMA et al., 2010; GLENNON et al., 1999). Além da conhecida interação de β Cs com receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, alguns são capazes de ligar-se com alta afinidade a receptores benzodiazepínicos (BZ), apresentando propriedades ansiogênicas ou ansiolíticas (GLENNON et al., 1999). Promovem inibição da MAO-A (enzima monoamino-oxidase tipo A), acarretando em atividade análoga às drogas IMAO (inibidoras da MAO), o que está relacionado ao efeito alucinógeno de β Cs, juntamente à similaridade estrutural à serotonina e triptamina (MOURA, 2006). Além dos fatores descritos, o grupo dos β Cs tem sido foco de estudos fitoquímicos e farmacológicos devido a suas estruturas únicas e diversas atividades biológicas reportadas, como antitumoral, antimicrobiana, inseticida, antimalárica, antinociceptiva, inibidora da mieloperoxidase, antioxidante, anti-inflamatória e efeitos analgésicos (WANG et al., 2014).

3.4.3 Alcaloides relacionados à intoxicação animal

Devido à falta de informação acerca de espécies vegetais com atividades tóxicas (ATAÍDE et al., 2019), a ocorrência de mortes em rebanhos bovinos ocasionada por intoxicação pelo consumo de plantas é frequente (ROSSETTI; CORSI, 2009). Dentre as espécies relacionadas aos quadros tóxicos em animais, ocasionam hepatotoxicidade em rebanhos bovinos os gêneros *Cestrum*, *Sessea* e *Senecio* (ROSSETTI; CORSI, 2009), além de *Vestia* (BREVIS et al., 2005; McKEOUGH et al., 2005), todos representantes de Solanaceae.

O gênero *Senecio* destaca-se pelos seus metabólitos secundários conhecidamente tóxicos: alcaloides pirrolizidínicos, relacionados à intoxicação de animais herbívoros de grande porte (MERINO, 2018). Em relação ao gênero *Cestrum*, diversas espécies são relacionadas à intoxicação animal: *Cestrum intermedium*, envolvida na intoxicação de rebanhos bovinos, não apresenta relatos sobre os metabólitos secundários envolvidos no quadro tóxico observado (FURLAN et al., 2008; BANDARRA et al., 2009; WOUTERS et al., 2013).

Cestrum laevigatum (sinônimo de *Cestrum axillare*), que desencadeia quadro tóxico em gado bovino similar ao observado para *Cestrum intermedium*, também afeta

ovinos, caprinos e bubalinos (COUTINHO et al., 2013; MARINHO et al., 2018). Os compostos responsáveis pela hepatotoxicidade observada nestes animais também não foram elucidados, porém alguns autores atribuem a toxicidade às saponinas identificadas em *C. laevigatum* (gitogenina e digitogenina) (MARINHO et al., 2018; ATAÍDE et al., 2019).

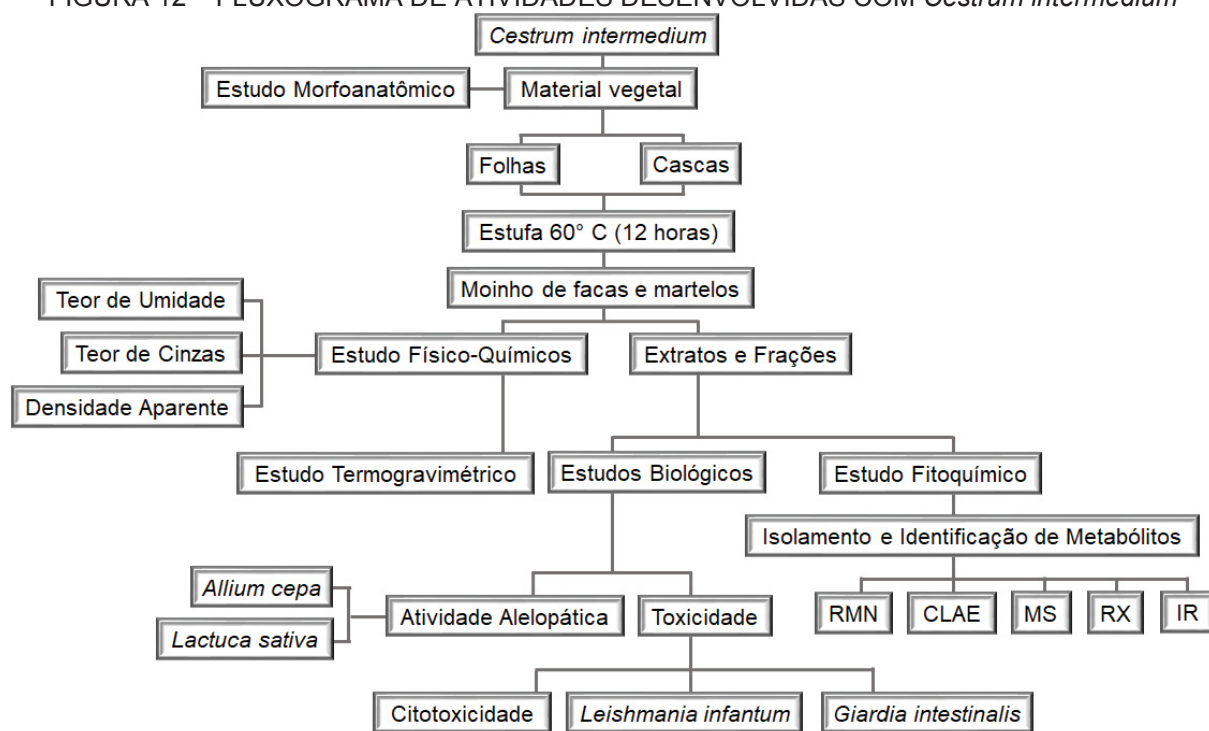
Cestrum sendtnarium provoca processo diarréico em gado bovino (relacionado à presença de saponinas), ausente nas intoxicações por *C. intermedium* e *C. laevigatum*. Esta informação indica que outras substâncias podem estar relacionadas à intoxicação típica provocada por estas duas espécies (AFONSO; SANTOS, 1995), não havendo necessariamente relação aos marcadores quimiotaxonômicos do gênero, as saponinas. As intoxicações ocasionadas por *Sessea* assemelham-se às observadas em *Cestrum laevigatum* (ROSSETTI; CORSI, 2009) e *C. intermedium*, não sendo relacionadas a substâncias específicas.

O gênero *Vestia* é reportado em relação à toxicidade de *Vestia foetida*, que ocasiona hepatotoxicidade em cabras. A intoxicação destes animais está relacionada à presença de alcaloides indólicos, especificamente β -carbolínicos, sendo esta classe reportada apenas nesta espécie vegetal em Solanaceae (BREVIS et al., 2005; McKEOUGH et al., 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a continuidade e evolução do estudo desenvolvido como dissertação de mestrado de SZABO (2015), foi essencial o aprofundamento à investigação dos aspectos fitoquímicos desta espécie. O resumo de atividades desenvolvidas no presente trabalho está exposto na FIGURA 12.

FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS COM *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020).

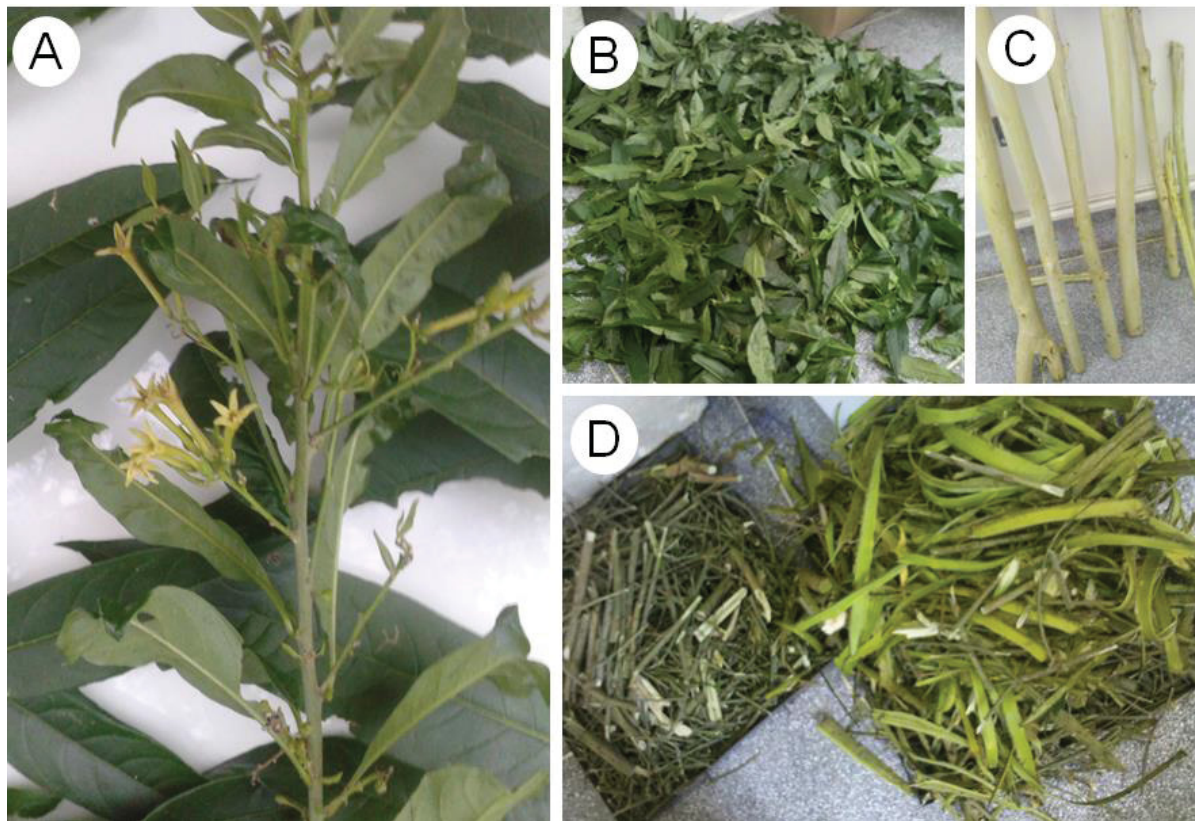
4.1 MATERIAL BOTÂNICO

A investigação científica de *Cestrum intermedium* foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” nº 02001.001165/2013-47. Avaliando ramos do indivíduo alvo, a identificação taxonômica foi realizada pelo curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba, onde ocorreu depósito de exsicata do material (MBM384025).

A coleta do material botânico ocorreu em junho de 2015 em Curitiba, Paraná (25°26'46.3"S 49°20'50.5"W), sendo parte dos ramos frescos reservados para o estudo morfoanatômico (itens 4.2 e 5.2) e o restante processado para os demais ensaios. Primeiramente, o material foi segregado, gerando dois objetos de estudo:

folhas e cascas. O material denominado cascas refere-se à união de ramos finos com as cascas de ramos espessos, como ilustra a FIGURA 13.

FIGURA 13 - MATERIAL BOTÂNICO FRESCO: PREPARO PARA PROCESSAMENTO



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: a) Ramos de *Cestrum intermedium* recém coletados
b) Folhas removidas de ramos
c) Lenho de ramos espessos (descartados)
d) Cascas: Ramos finos e cascas de ramos espessos

Separadamente, as folhas e cascas foram desidratadas em estufa (60° C) por 12 horas para frear processos enzimáticos e degradação, garantindo integridade e estabilização do material botânico, seguindo o método descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (BRASIL, 2019). Em seguida, foram trituradas em moinho de facas e martelos (TRAPP, modelo TR40), obtendo material com maior superfície de contato, otimizando a extração dos metabólitos secundários pela percolação de solventes. As folhas e cascas secas, estabilizadas e trituradas foram armazenadas ao abrigo de luz em local fresco de baixa umidade. Os referidos materiais foram empregados em todas as atividades descritas, resumidas na FIGURA 12, exceto no Estudo Morfoanatômico (Item 4.2).

4.1.1 Ensaios Físico-Químicos

O estudo físico-químico consiste em ensaios empregados para controle de qualidade de drogas vegetais, sendo úteis para estabelecer e verificar parâmetros das espécies. Utilizando material seco, estabilizado e triturado foram realizados os ensaios de Determinação de Perda por Dessecação, Determinação do Teor de Cinzas Totais e Determinação de Densidade Aparente, de acordo com o método proposto na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). Além dos ensaios físico-químicos farmacopeicos clássicos, foi realizada a análise termogravimétrica (TGA) de folhas e cascas secas, estabilizadas e trituradas (ASTM, 1983).

4.1.1.1 Determinação da Perda por Dessecação

O ensaio foi executado através do método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (BRASIL, 2019). Em cadinhos de porcelana previamente secos, padronizados e identificados, alíquotas de 1 g foram avaliadas em triplicata. O conjunto foi levado à estufa de circulação forçada de ar a 100-105°C por cinco horas e resfriado em dessecador, permanecendo livre de variação de massa por absorção de umidade do ar. Após resfriamento completo, procedeu-se à pesagem.

O teor de umidade pode ser determinado como demonstrado na Equação 1, baseada na diferença de massa referente à umidade dos materiais, caracterizando a perda por dessecação (em Umidade %, porcentagem de umidade). O material seco em estufa refere-se às amostras ao fim do ensaio, enquanto o material estabilizado refere-se às alíquotas de 1 g.

(1)

$$U\% = \frac{(\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho Material Seco em Estufa}) \times 100}{\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho}}$$

4.1.1.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Após a Determinação do Teor de Umidade, a Determinação do Teor de Cinzas foi realizada em sequência, com o material seco em estufa, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (BRASIL, 2019). Os cadinhos recém-pesados

(sextuplicata) na etapa final da Determinação do Teor de Umidade foram inseridos em mufla, com aumento de temperatura gradativo até $600 \pm 25^\circ \text{C}$, até total incineração do material, tornando-se cinzas. Os cadinhos foram colocados em dessecador para resfriamento, assim evitando variação de massa por absorção de umidade do ar. Após resfriamento total, procedeu-se à pesagem e o Teor de Cinzas Totais foi calculado em relação material estabilizado, de acordo com a Equação 2:

(2)

$$\text{Cinzas\%} = \frac{(\text{Massa Cadinho Cinzas} - \text{Massa Cadinho}) \times 100}{\text{Massa Cadinho Material Estabilizado} - \text{Massa Cadinho}}$$

4.1.1.3 Determinação da Densidade Aparente

A determinação da densidade aparente do material foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). A partir do material seco, estabilizado e triturado foi determinada a densidade aparente das folhas e cascas em triplicata, verificando o volume que o material compactado de massa conhecida ocupa em proveta de plástico após um número padronizado de batidas.

4.1.1.4 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) avaliou a degradação térmica de folhas e cascas individualmente, avaliando a perda de massa ao longo do processo de aquecimento das amostras (10 mg) de 20°C a 600°C (10°C/min). O ensaio foi conduzido no equipamento LABSYS EVO TGA/STA-EGA (SETARAN), previamente calibrado com padrão de Índio (Ponto de Fusão: $156,6^\circ \text{C}$; Variação de Entalpia de Fusão: $28,54 \text{ J/g}$) (ASTM, 1983). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística no software Origin 9.0.

4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

O estudo morfoanatômico foi iniciado em material fresco, recém coletado, procedendo às caracterizações macroscópicas. A determinação das dimensões, estabelecidas através da média simples do comprimento e largura, foi realizada com

paquímetro digital (CD-15CX, Mitutoyo®). Em seguida, pequenos ramos de *Cestrum intermedium* foram fixados em solução FAA 70 (5 mL de formol 40%, 5 mL ácido acético glacial e 90 mL álcool etílico a 70%) por 24 horas, a fim de bloquear o metabolismo das células, preservando sua integridade (JOHANSEN, 1940). Ao término do período de fixação, o material foi armazenado em álcool etílico (70%) até a inicialização dos procedimentos para avaliação morfoanatômica microscópica e testes histoquímicos das folhas e caules (BERLYN; MIKSCHE, 1976). A terminologia empregada na análise microscópica de *Cestrum intermedium* foi baseada em Metcalfe e Chalk (1950).

Para a análise em microscopia óptica, foram realizados cortes paradérmicos e transversais das folhas e caules à mão livre com o auxílio de isopor como suporte (QUINTAS, 1963), realizando a coloração de estruturas acidófilas e basófilas com azul de astra e safranina, respectivamente (ROESER, 1972). Na confecção das lâminas foi utilizada solução de glicerina 50%, com intuito de preservar o material (BEÇAK; PAULETE, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997), além da aplicação de esmalte nas bordas da lamínula, retardando modificações ao impedir contato com o ambiente, tornando a lâmina semi-permanente (BEÇAK; PAULETE, 1976). Os cortes foram analisados e fotografados nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x em microscópio fotônico (BX40, Olympus®).

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada de acordo com Souza (2007). Amostras dos ramos acondicionados em etanol 70% sofreram desidratação crescente, sendo transferidas entre soluções de etanol 80%, 90% e 100% sequencialmente. Em aparelho CPD-030 (Balt-Tec®), ocorreu total substituição de álcool etílico por CO₂, atingindo ponto crítico, para então o material ser metalizado com ouro (SCD-030, Balzers®). A metalização sobre todas as reentrâncias e proeminências promove aumento da condutividade da superfície da amostra, obtendo melhor resolução de detalhes, observados em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL®) em imagens tridimensionais.

Testes histoquímicos foram realizados no material fixado em FAA, exceto a detecção de terpenoides com grupo carbonila, que utilizou material fresco. Os ensaios histoquímicos empregaram reagentes e metodologias clássicas para pesquisa de marcadores químicos (QUADRO 6). Após a obtenção de cortes transversais à mão livre na porção mediana do material, os reagentes específicos para pesquisa de

grupos foram incorporados. Em seguida, os cortes foram lavados com água destilada e inseridos em lâmina com glicerina, sendo observados e fotografados em microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®). Para a verificação do aspecto natural dos órgãos e secreções, seções sem tratamento foram observadas paralelamente.

QUADRO 6 – REATIVOS UTILIZADOS NO ESTUDO HISTOQUÍMICO DE *Cestrum intermedium*

CLASSE DE METABÓLITO	REATIVO	REFERÊNCIA
Flavonoides	Cloreto de Alumínio	(CHARRIERE-LADREIX, 1976)
Alcaloides	Dragendorf e Bertrand	(MOREIRA, 1979)
Compostos Fenólicos	Cloreto Férrico	(JOHANSEN, 1940)
Esteroides	Liebermann-Bouchard	(MOREIRA, 1979)
Amido	Lugol	(BERLYN; MIKSCHKE, 1976)
Lignina	Floroglucinol-HCl	(JOHANSEN, 1940)
Lipídeos Totais	SUDAM III	(PEARSE, 1980)
Polissacarídeos	PAS-Àc. Periódico/R. de Schiff	(MCMANUS, 1948)
Terpenoides	2,4-dinitrofenil-hidrazina	(GANter; JOLLÉS, 1969)
Protoantocianidinas	Vanilina sulfúrica (vanilina 2% em ácido sulfúrico 50%)	Adaptado de Scalbert (1992) e Price et al. (1978)
Peroxidases	0,2% guaiacol, 0,05% 4-cloro-1-naftol (2 mM) e tetrametilbenzidina (TMB)	(KRISHNAMURTHY, 1999)
Superóxido Dismutase	1 µL nitroazul de tetrazólio	(GAHAN; KALINA, 1968)
Proteínas Totais	Azul Brilhante de Coomassie	(FISCHER, 1968).

FONTE: A autora (2020).

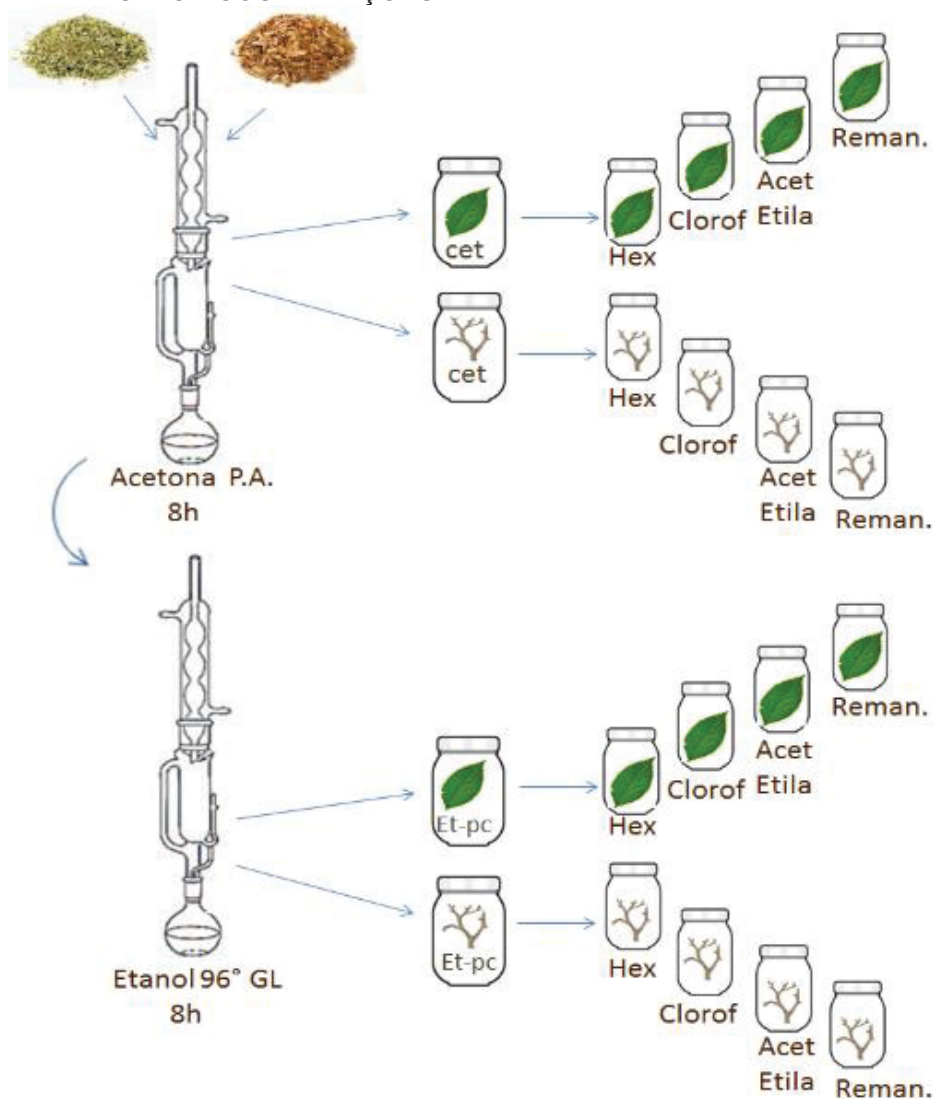
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Como ilustrado no fluxograma (FIGURA 12), folhas e cascas secas, estabilizadas e trituradas foram submetidas ao processo de extração. Separadamente, ao longo de 8 horas, os materiais vegetais foram submetidos a refluxo contínuo de acetona (padrão analítico) em aparelho de Soxhlet. Após este procedimento, o material recém processado em acetona foi submetido a refluxo contínuo em aparelho de Soxhlet, desta vez utilizando o etanol (96° GL) como solvente extrator. Portanto, foram obtidos extratos cetônicos e, em sequência, etanólicos de folhas e cascas.

Os extratos foram filtrados a vácuo em funil de Büchner, concentrados em evaporador rotatório, recuperando parte dos solventes extratores, e posteriormente levados ao banho-maria (70 °C) acondicionado em capela até secura. Assim foram obtidos os extratos brutos concentrados denominados extrato bruto cetônico (EBCet) e extrato bruto pós-cetônico (EBPCet) de folhas e cascas de *Cestrum intermedium*.

Alíquotas dos extratos das folhas e cascas foram reservadas e o material restante foi particionado, objetivando a segregação de metabólitos presentes de acordo com sua polaridade. Empregando extração líquido-líquido em Soxhlet modificado, o fracionamento ocorreu em escala crescente de polaridade com solventes padrão analítico. Em etapas sequenciais, os solventes extratores hexano, clorofórmio e acetato de etila, deram origem às frações Hexano, Clorofórmio e Acetato de Etila, respectivamente. O resíduo da última etapa de fracionamento em acetato de etila foi denominado fração remanescente. Assim como os extratos, as frações obtidas foram concentradas até *secura* e armazenadas sob refrigeração. A FIGURA 14 demonstra resumidamente as etapas do processo de obtenção destes extratos e frações.

FIGURA 14 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS CETÔNICOS, PÓS-CETÔNICOS E FRAÇÕES

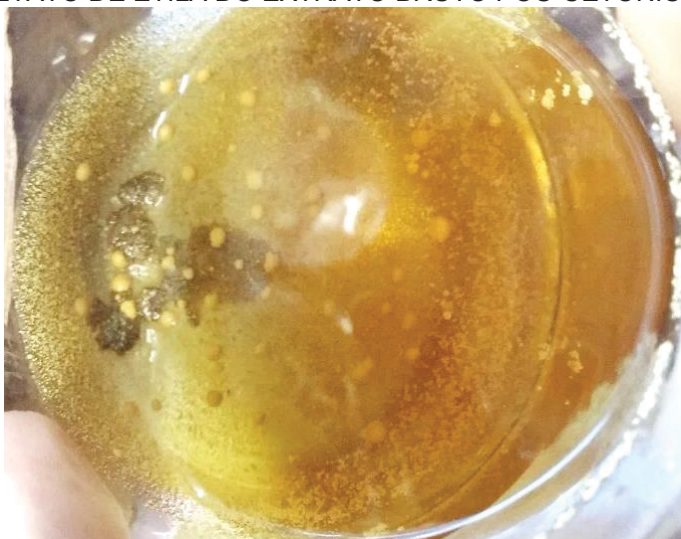


FONTE: A Autora (2020).

Durante o período de evaporação em banho-maria, na fração Acetato de Etila proveniente do Extrato Bruto Pós-Cetônico das Cascas, um pó amarelado precipitou (aproximadamente 1,6 g) (FIGURA 15). Este precipitado foi denominado de Componente Majoritário (MAJ) (descrito em detalhes nos itens 5.4.5, 5.4.6 e 5.4.6.1), passando a ser empregado como objeto de estudo, sendo incluído como amostra em análises biológicas.

Por fim, foram obtidas vinte e uma (21) amostras provenientes do material vegetal: extrato bruto cetônico das folhas e cascas, extrato bruto pós-cetônico das folhas e cascas, além das frações hexânicas, clorofórmicas, acetato de etila e remanescentes de ambos os extratos das folhas e cascas, além do componente majoritário (MAJ). Para os fins investigativos deste trabalho, com exceção do componente majoritário, estas amostras foram destinadas preferencialmente ao isolamento e identificação de metabólitos secundários.

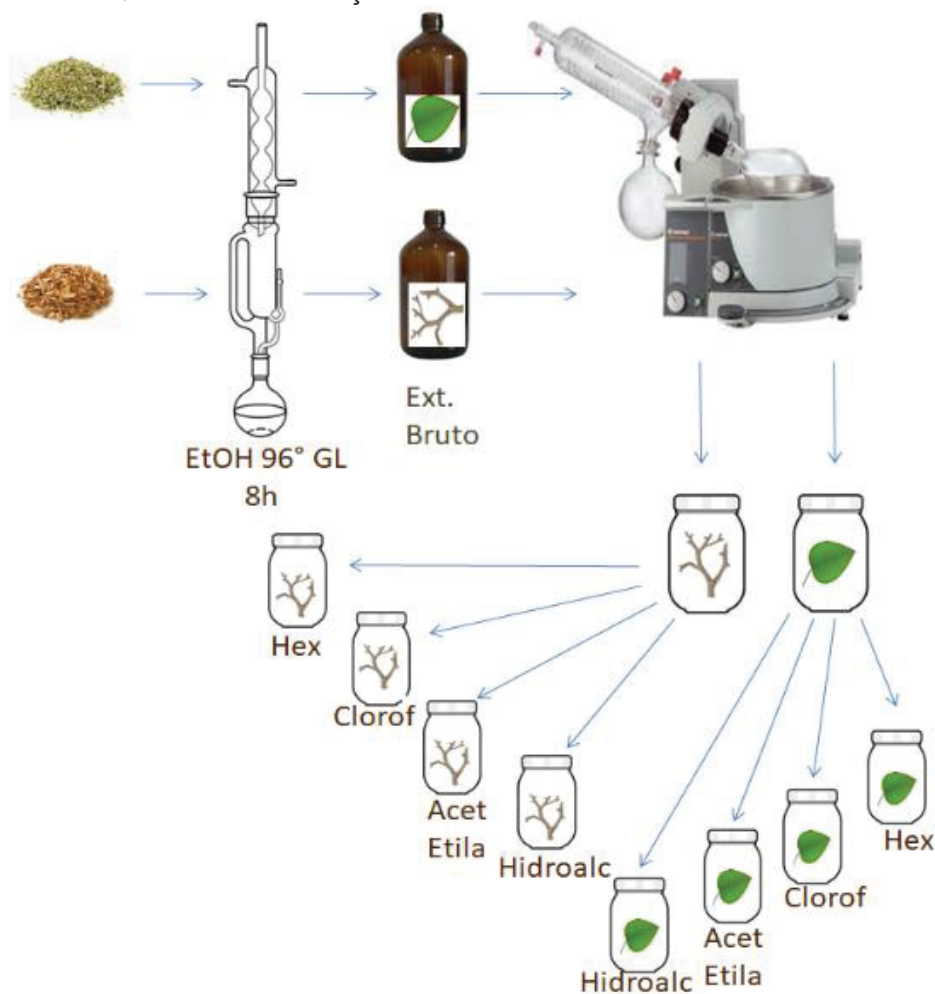
FIGURA 15 – COMPONENTE MAJORITÁRIO (MAJ): PRECIPITADO AMARELO NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO BRUTO PÓS-CETÔNICO DAS CASCAS



FONTE: A autora (2020).

Alinhando-se ao propósito de continuidade do estudo iniciado em Szabo (2015), os bioensaios foram realizados com extratos brutos etanólicos de *Cestrum intermedium* e suas frações. Para tais ensaios, portanto, não foi realizada extração prévia com acetona, sendo os extratos brutos etanólicos de folhas e cascas obtidos em única etapa em refluxo contínuo de etanol 96 °GL em aparelho de Soxhlet. Na sequência, foram particionados com hexano, clorofórmio e acetato de etila em etapas subsequentes, como resumidamente demonstra a FIGURA 16.

FIGURA 16 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES



FONTE: Szabo (2015)

4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

Objetivando a progressão do estudo fitoquímico de extratos brutos etanólicos de *Cestrum intermedium*, iniciado em Szabo (2015), o presente estudo explorou etapas extras de purificação dos compostos da espécie. Assim, optou-se como estratégia a investigação de extratos brutos diferenciados: cetônico e pós-cetônico, extraídos subsequentemente do mesmo material vegetal.

Obteve-se o extrato etanólico posteriormente à extração cetônica com expectativa de apresentar características diferenciadas quando comparado ao extrato bruto etanólico obtido em única etapa: a remoção prévia de componentes menos polares, devido à diferença de polaridade entre acetona e etanol (MARTINS et al., 2013; PHENOMENEX, 2020). Portanto, a estratégia adotada originaria extratos etanólicos mais purificados quando comparados aos investigados anteriormente,

contribuindo com o processo de purificação e isolamento de seus componentes. A purificação, isolamento e identificação de metabólitos secundários consistiu no processamento de extratos e principalmente das frações, associando diferentes técnicas de análise instrumental.

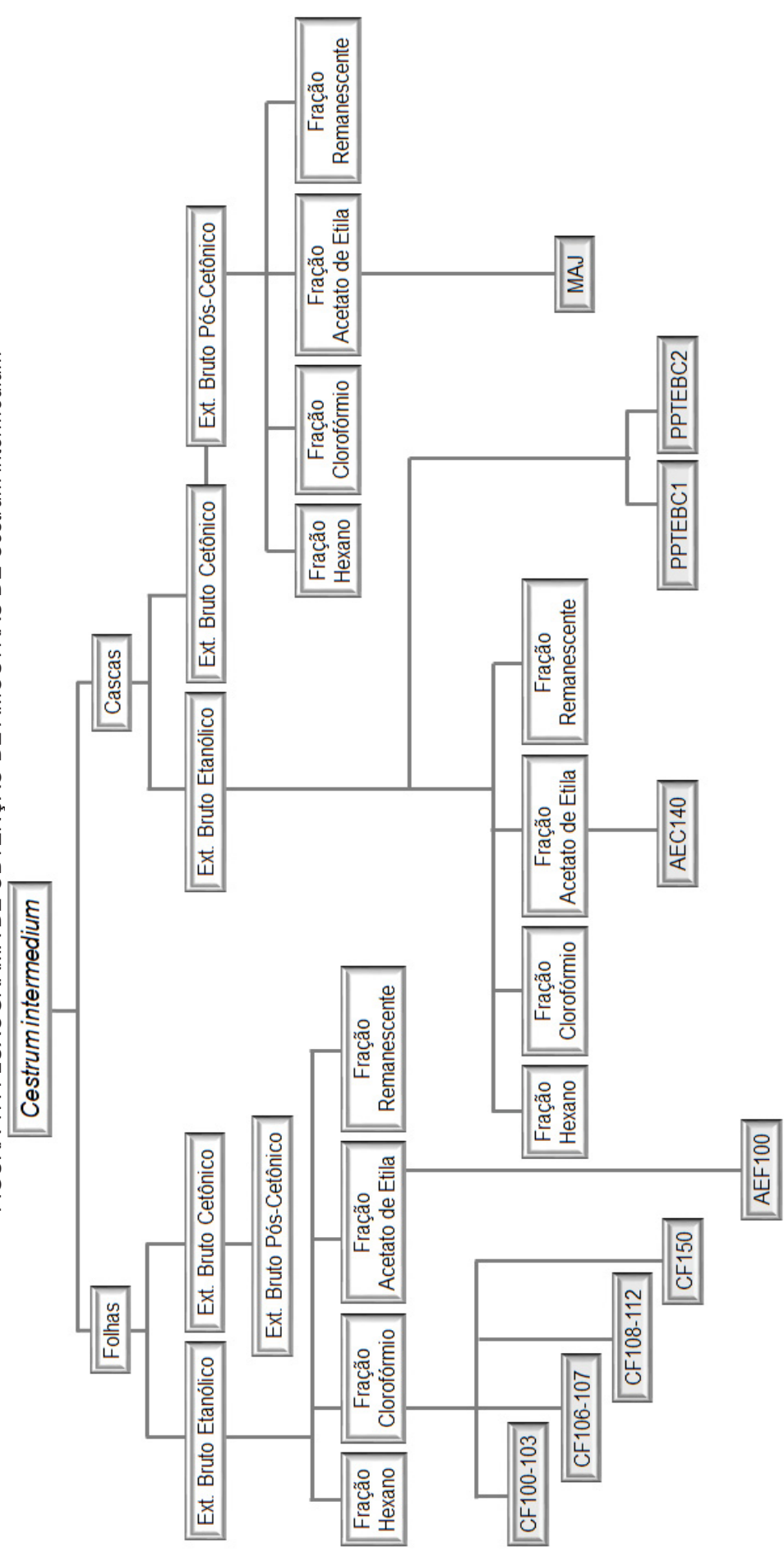
4.4.1 Purificação e Isolamento de compostos

A purificação e isolamento de compostos de *Cestrum intermedium* empregou cromatografia líquida em coluna (CLC) como procedimento padrão, utilizando sílica-gel 60 (0,063-0,2 mm Merck®) como fase estacionária. A fase móvel consistiu em diferentes proporções de eluentes, promovendo gradiente de polaridade crescente ao longo da eluição. O controle de eluição ocorreu através do monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatoplasas de sílica gel 60 (F254 Merck®), visualizadas com lâmpadas ultravioleta (UV) (360 nm).

Assim, as frações clorofórmio das folhas e acetato de etila dos extratos brutos etanólicos de folhas e cascas foram processadas, sendo diluídas em metanol e incorporadas proporcionalmente a duas partes de sílica, triturando em gral até completa evaporação do solvente. Cada pastilha foi empacotada em coluna de vidro entre folhas de papel filtro (razão sílica/pastilha 5:1). Como fase móvel foi empregada a variação entre hexano-clorofórmio-acetato de etila-metanol.

As amostras obtidas destas colunas (CF100-103, CF 106-107. CF108-112, CF150, AEF100 e AEC140) e outras, obtidas diretamente dos extratos (PPTEBC1, PPTEBC2, MAJ), estão dispostas no fluxograma (FIGURA 17) e foram analisadas para identificação de suas estruturas através das técnicas descritas a seguir.

FIGURA 17: FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020).

4.4.2 Screening e Identificação de compostos

O *screening* fitoquímico de extratos e frações de *Cestrum intermedium* foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo utilizado como suporte para a identificação de compostos juntamente espectroscopia de infravermelho (IV), difratometria de raios-X (RX), além de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

4.4.2.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

De maneira geral, as amostras foram solubilizadas em metanol (20 mg/mL) e analisadas em cromatógrafo a líquido (Merck Hitachi – Elite Lachrom) com detector arranjo de diodos (DAD) (leitura na faixa 220-400 nm) e coluna preparativa de fase reversa (Xterra® RP18 – 4,6 x 250 mm; 5 µm), injetor manual, com volume de injeção de 20 µL. Como fase móvel foi utilizado gradiente de eluição de 1 mL/minuto com (A) H₂O MilliQ:H₃PO₄ a 0,1% e (B) metanol grau HPLC na seguinte programação: 1-45 minutos, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 minutos com 100% de fase B.

4.4.2.2 Análise por Espectroscopia em Infravermelho (IV)

A amostra PTEBC1 foi analisada por espectroscopia de infravermelho no Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR/FTIR), modelo Alpha (Bruker Optics). Os espectros foram adquiridos por reflectância da região do infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹).

4.4.2.3 Análise por Difratometria de Raios-X

As amostras PTEBC2 e AEC140 (ambas sólidos brancos cristalinos) foram analisadas por difratometria de raios-X de Monocristal no Laboratório de Difração de Raios X de Monocristal – Departamento de Química, UFPR.

Selecionou-se um fragmento cristalino de uma porção de cristais imersos em óleo mineral, cuidadosamente transferido para micro-mount que foi fixado no goniômetro

do difratômetro Bruker D8 Venture, equipado com detector de área Photon 100 CMOS. Utilizando duas fontes de radiação monocromática: Mo-K α ($\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$) e Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo Kryoflex II. As análises foram realizadas a 300 K utilizando-se a fonte de molibdênio. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3 1.

4.4.2.4 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no Centro de RMN da UFPR. As amostras foram submetidas a análises espectrométricas para a determinação estrutural dos compostos. Os espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT 135, e experimentos bidimensionais de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC).

Quanto ao preparo das amostras, as amostras AEF100, MAJ e CF150C foram diluídas em DMSO- d_6 contendo 0,1% (v/v) de TMS; as amostras FC100-103 e CF108-112 em CDCl_3 contendo 1% (v/v) de TMS; e a amostra CF 106-108 em CD_3OD .

Quanto ao equipamento utilizado para análise, as amostras CF150C, CF100-103, CF100-107 e CF108-112 foram analisadas em espectrômetro de RMN Bruker Ascend 600 MHz, operado a 14,1 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C nas frequências de 600,1 e 150,9 MHz, respectivamente, em equipamento com sonda multinuclear de detecção inversa (^1H , ^{13}C e ^{15}N) de 5 mm e gradiente de campo no eixo z. A amostra AEF100 foi analisada em espectrômetro de RMN Bruker DPX 200 MHz, operado a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C nas frequências de 200,1 e 50,3 MHz, respectivamente, em equipamento com sonda quadrinuclear de detecção direta (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) de 5 mm. A amostra MAJ, analisada em espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400 MHz, operado a 9,4 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C nas frequências de 400,1 e 100,6 MHz, respectivamente, em equipamento com sonda multinuclear de detecção direta (X-núcleo e ^1H) de 5 mm e gradiente de campo no eixo z.

Os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), como referência interna, em 0,00 ppm. Os experimentos de HSQC e HMBC foram otimizados para uma média de constante de acoplamento $^1J_{(\text{H,C})}$ e $^{\text{LR}}J_{(\text{H,C})}$ de 145 e 8 Hz, respectivamente. Os dados obtidos foram comparados com os dados de literatura.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Objetivando continuidade da investigação de atividades biológicas de *Cestrum intermedium*, iniciada em Szabo (2015), o presente estudo buscou garantir linearidade em relação aos bioensaios prévios, possibilitando correlação entre dados. Assim, empregou-se exclusivamente extratos brutos etanólicos e suas frações nos ensaios biológicos descritos a seguir.

A escolha dos organismos-teste eleitos para a continuidade de investigação de atividades biológicas da espécie foi norteadada pelos bioensaios de Szabo (2015). A toxicidade em *Artemia salina* é utilizada como preditor de atividades biológicas, comumente correlacionando-se à toxicidade a culturas celulares tumorais, parasitas, tripanossoma, vírus e micro-organismos. A partir do estabelecimento de parcerias, foi possível fazer avaliação da atividade de *Cestrum intermedium* em células tumorais, promastigotas de *Leishmania infantum* e macrófagos infectados pelos promastigotas, além do parasita intestinal *Giardia intestinalis*, um protozoário flagelado.

A avaliação da atividade alelopática de matrizes vegetais é o caminho inicial para desenvolvimento de herbicidas de origem natural, abrindo possibilidade para novos mecanismos de ação e menores impactos ao ambiente (CÂNDIDO, 2011). Devido aos relatos de espécies e componentes químicos de Solanaceae sendo empregados como biopraguicidas e bioherbicidas (LORENZI; MATOS, 2008; ASHIHARA et al., 2008; GOYAL, 2013), optou-se por investigar preliminarmente a atividade alelopática de *Cestrum intermedium*.

4.5.1 Avaliação da Atividade Alelopática

A atividade alelopática de *Cestrum intermedium* foi avaliada em sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola), analisando a influência das amostras aos processos de germinação e desenvolvimento de radículas e hipocótilos. Empregando caixas de germinação (gerbox) divididas em quadrantes contendo cinco sementes, o ensaio foi realizado em quadruplicatas (FIGURA 18) no Laboratório de Farmacotécnica (Departamento de Farmácia – UFPR).

FIGURA 18 – PLACA GERBOX DIVIDIDA EM QUADRANTES



FONTE: A Autora (2020)

Sobre papel filtro acondicionado ao fundo do gerbox, foram colocados 5,0 mL de soluções aquosas dos extratos brutos etanólicos das folhas (EBF) e cascas (EBC) e do componente majoritário dos extratos (MAJ) nas concentrações de 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1.000 µg/mL. Para dissolução das amostras, dimetilsulfóxido (DMSO) foi empregado, sendo o desenvolvimento das sementes também avaliado em solução aquosa de DMSO 1% em água destilada (concentração final de DMSO nas soluções-teste). Para fins de controle, as espécies alvo foram expostas à água destilada. Em seguida, as gerbox foram semeadas e incubadas em câmara de germinação (umidade relativa \pm 80%; temperatura constante \pm 25 °C), conforme Brasil (2009).

4.5.1.1 Teste de Germinação

O bioensaio de germinação foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Macias et al. (2000). Após incubação por 24 horas, procedeu-se à contagem do número de sementes germinadas, removendo-as. As gerbox foram reincubadas e as sementes contadas diariamente ao longo de sete dias. Foram estimados o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Equação 3) e Índice de Inibição/Favorecimento de germinação (Equação 4) (MAGUIRE, 1962), Porcentagem de Germinação (%G) (Equação 5) (BRASIL, 2009), Tempo Médio de Germinação (TMG) (Equação 6) e Velocidade Média de Germinação (Equação 7) (LABOURIAU, 1983):

$$\text{IVG} = \frac{\sum ni}{\sum ti} \quad (3)$$

Onde: IVG = Índice de Velocidade de Germinação
 ni = número de sementes germinadas no tempo i
 ti = tempo em dias após o início do ensaio

$$\text{Índice de Inibição/Favorecimento} = \frac{ni - ni \text{ controle}}{ni \text{ controle}} \quad (4)$$

Onde: ni = número de sementes germinadas no tempo i
 ni controle = número de sementes do controle germinadas no mesmo tempo i

$$\%G = \left(\frac{ni}{N} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde: %G = Porcentagem de Germinação
 ni = número de sementes germinadas no tempo i
 N = número total de sementes que foram empregadas para germinar

$$\text{TMG} = \frac{\sum (ni \cdot ti)}{\sum ni} \quad (6)$$

Onde: TMG = Tempo Médio de Germinação
 ni = número de sementes germinadas no tempo i
 ti = tempo em dias após o início do ensaio
 (resultado expresso em dias)

$$\text{VMG} = \frac{1}{\text{TMG}} \quad (7)$$

Onde: VMG = Velocidade Média de Germinação
 TMG = Tempo Médio de Germinação
 (resultado expresso em sementes ao dia)

Os valores de porcentagem e de índice de velocidade de germinação foram comparados pelo teste de variância ANOVA e as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. O teste de Tukey apontou as amostras estatisticamente semelhantes ou diferentes por meio de grupamentos. As análises estatísticas foram realizadas no software Minitab 18 e Microsoft Office 365 – Excel.

4.5.1.2 Teste de Crescimento

Para o bioensaio de crescimento foi utilizada a metodologia descrita por Barnes et al. (1987) e Macias et al. (2000). Após sete dias de incubação das sementes de alface e quinze dias das sementes de cebola, foi medido o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleótilo com auxílio de papel milimetrado.

Os valores obtidos para o comprimento do hipocótilo e da radícula foram submetidos ao teste de normalidade de Ryan-Joiner, para que o teste de ANOVA fosse adequadamente empregado. Em seguida, as amostras foram submetidas ao teste para a verificação de outliers (valores discrepantes). Após o ajuste nos grupos,

os resultados foram comparados pela análise de variância ANOVA e as médias verificadas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas no software Minitab 18 e Microsoft Office 365 – Excel. O nível de atividade de crescimento foi expresso em porcentagem de inibição/estímulo de acordo com a Equação 8:

(8)

$$\% \text{ Atividade de Crescimento} = \frac{(\text{MT} - \text{MC}) \cdot 100\%}{\text{MC}}$$

Onde: MT = média de alongamento dos tratamentos

MC = média de alongamento do controle

4.5.2 Avaliação da Atividade Citotóxica

O potencial citotóxico foi avaliado utilizando o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) (DENIZOT; LANG, 1986; RISS et al, 2013) nas seguintes linhagens celulares humanas: ATCC 87MG (linhagem epitelial – glioblastoma), ATCC HT29 (linhagem epitelial – câncer de cólon), ATCC U937 (linhagem monocítica – linfoma), ATCC THP1 (linhagem monocítica – leucemia mieloide aguda), ATCC K562 (linhagem linfoblástica – leucemia mieloide crônica) e ATCC H460 (linhagem pleural – carcinoma pulmonar).

As células foram cedidas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – CPQBA/UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) em Campinas – SP. O transporte deste material foi realizado por empresa terceirizada (SPS Healthcare) em garrafas de meio de cultivo. O manuseio das linhagens celulares seguiu indicações de Freshney (2010), sendo o ensaio realizado em parceria com a Professora Doutora Maria de Fátima Cepa Matos na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

As células foram transferidas para garrafas de cultivo estéreis contendo meio completo (meio Dulbecco suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10%) adicionado de 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina). Este material foi mantido em incubadora (27 °C) de atmosfera úmida, contendo CO₂ (5%) por 24 horas para aderência celular. No momento de utilização, as células aderidas foram removidas a partir da adição de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1mmol/L) em tampão fosfato salino (PBS) (pH de 7,4). Em seguida, as células foram transferidas para tubos cônicos com meio de cultura completo, sendo

centrifugados em baixa rotação por 10 minutos. Então, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas meio completo e a concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer.

A suspensão de células ($10^4/\text{mL}$) foi semeada em placas de 96 poços ($100\text{ }\mu\text{L}/\text{poço}$) em meio RPMI1640 – SFB10% (RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de SFB). Em seguida, as placas foram incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera úmida com CO_2 (5%), por 24 horas para total adesão à superfície (80% de confluência). Após adesão, o meio de cultura foi substituído por RPMI1640 – SFB10% com diferentes concentrações dos extratos e frações de *Cestrum intermedium* (0,1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as placas foram reincubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Como controle positivo, foi utilizado a Doxorrubicina (quimioterápico) em concentrações que variaram entre 0,025 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ao fim deste período, solução estoque de MTT em PBS (5 mg/mL) foi adicionado ($10\text{ }\mu\text{L}/\text{poço}$), sendo as placas reincubadas por uma hora. As células viáveis reduzem o MTT a formazan, cristais azuis escuro insolúveis: aspirando o sobrenadante, a adição de 100 μL de DMSO proporciona a dissolução dos cristais de formazan com auxílio de homogeneização em agitador de placas. O grau de redução do MTT pelas células foi avaliado em espectrofotômetro de microplacas (540 nm). A curva de metabolização do MTT (metabolização versus log das concentrações utilizadas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) reflete inibição de 50% do crescimento celular, determinando assim a IC_{50} , determinada no software Microcal Origin Versão 6.0.

4.5.3 Potencial leishmanicida

Os ensaios que avaliaram o potencial leishmanicida de *Cestrum intermedium* foram realizados em parceria com a Professora Doutora Maria de Fátima Cepa Matos na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.5.3.1 Toxicidade sobre promastigotas

A avaliação da toxicidade em promastigotas dos extratos e frações de *Cestrum intermedium* foi empregou o ensaio de MTT (DENIZOT; LANG, 1986; RISS et al, 2013). Promastigotas de *Leishmania* (L) *infantum* (MHOM/FR/71/LRM75) foram cultivados em meio de cultura Schneider's Insect Medium (Sigma) suplementado com

SFB 20% (Sigma) com adição de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1 mg/mL) a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,5% e como controle positivo Miltefosina, fármaco empregado no tratamento de leishmaniose, em concentrações de 0,2 a 10 µg/mL. O experimento foi realizado em triplicata e a percentagem de células viáveis foi calculada em relação aos controles, células cultivadas em meio contendo apenas DMSO na concentração de 0,5% v/v (VEGA et al., 2005).

Promastigotas *Leishmania* (L) *infantum* ($8 \cdot 10^6$) (meio RPMI 1640 – SFB10% com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1 mg/mL)) foram adicionados a placas de 96 poços. Em seguida, foram inseridos os extratos brutos etanólicos e frações de folhas e cascas de *Cestrum intermedium* nas concentrações de 10 a 1000 µg/mL, previamente solubilizados em DMSO 0,5%, e controles. As placas foram incubadas durante 48 horas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo CO₂ (5%).

Após este período, foi adicionada solução de MTT (2 mg/mL, 50 µL/poço), e as placas foram reincubadas (37 °C) por uma hora. Os organismos viáveis metabolizam o MTT, reduzindo-o a cristais de formazan (azul escuro). Após o período de incubação, foram acrescentados 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan, sendo quantificado em espectrofotômetro de microplacas (540 nm). Uma curva de regressão dose-resposta não-linear foi utilizada para calcular a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) (µg/mL), que foi determinada graficamente no software Microcal Origin 6.0.

4.5.3.2 Toxicidade sobre macrófagos

O ensaio de toxicidade sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi realizado conforme metodologia do ensaio de Avaliação de Atividade Citotóxica, descrita no item 4.5.2. Os macrófagos em suspensão (RPMI 1640 -SFB10%) foram semeados em placas de 96 poços (10³ células/poço), sendo incubadas em atmosfera úmida (5% de CO₂, 37°C) por 24 horas até a total adesão à superfície. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por RPMI 1640 -SFB10% com extratos e frações nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, sendo as placas reincubadas a 37 °C durante 48 horas. Como controle positivo, foi utilizado a Miltefosina em concentrações que variaram entre 0,025–25 µg/mL.

Após este período, solução de MTT (5 mg/mL em PBS) foi adicionada (30 µL/poço), sendo as placas reincubadas por quatro horas. Em seguida, o sobrenadante livre de células foi aspirado de cada poço e DMSO (100µL) foi adicionado para dissolver os cristais de formazan azul escuro, homogeneizando em agitador de placas. As células coradas foram visualizadas em microscópio óptico invertido (Nikon eclipse E200) e a redução do MTT em células foi verificada em espectrofotômetro de microplacas (540 nm). Uma curva de regressão dose-resposta não-linear foi utilizada para calcular a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) (µg/mL), que foi determinada graficamente em programa para gráficos e análises de dados (Microcal Origin 6.0).

4.5.3.3 Produção de Óxido Nítrico Sintetase Induzida (NOSi) em macrófagos infectados

Neste ensaio, macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placas de 96 poços (meio RPMI 1640–SFB10%; 10³ células/ poço), incubados em atmosfera úmida com CO₂ (5%) a 37°C por duas horas. Em seguida, as células foram infectadas com promastigotas de *L. infantum* (8.10⁶ células/poço) e incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Após este período, foram adicionados os extratos e frações de *Cestrum intermedium* (50-1000 µg/mL) e as microplacas reincubadas por 24 horas. Em seguida, 100 µL dos sobrenadantes foram recolhidos e adicionado o reagente de Gries (100 µL, 1:1 de soluções estoque de naftilenodiamina 0,1% em água e de sulfanilamina 1% em H₃PO₄ 5%, preparadas no momento do uso), de acordo com Stuehr e Marletta (1985). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (540 nm). Os valores de atividade de NOSi foram calculados através da curva de calibração $\epsilon = 91.9 \text{ Mm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Wenzl et al., 2011) e expressas em µM de NO₂⁻/min. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

4.5.4 Avaliação da toxicidade em *Giardia intestinalis*

A atividade tóxica de *Cestrum intermedium* foi avaliada em *Giardia intestinalis* seguindo a metodologia empregada em Missina et al. (2018), em parceria com o professor Bruno Gavinho, sendo realizado no Centro Universitário Campos de Andrade (UNIANDRADE). Trofozoítos de *Giardia intestinalis* (ATCC 50803) foram cultivados em meio TYI-S-33 (Sigma-Aldrich) suplementado com SFB 10% (Cripion) e penicilina/estreptomicina (10.000 UI) em atmosfera de CO₂ e O₂ (5:95). Os organismos-teste foram contados em câmara de Neubauer em microscópio óptico (10⁵ trofozoítos/mL), sendo 100 µL de suspensão (meio TYI-S-33) inseridos em tubos de cultivo de poliestireno. Foram adicionados meio TYI-S-33 contendo soluções aquosas dos extratos brutos etanólicos de folhas (EBF) e cascas (EBC), além do componente majoritário (MAJ) para avaliação preliminar de toxicidade. A concentração final das amostras nos tubos foi 1000 µg/L. Diluições seriadas (0,025 a 200 µmol/L) de meio TYI-S-33 e Albendazol foram empregadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os tubos foram incubados (37° C) em atmosfera de CO₂ e O₂ (5:95), sendo o crescimento celular determinado em hematocitômetro em microscópio óptico. A população trofozoíta do sobrenadante (células não aderidas) foi determinada em alíquotas de 10 mL. Após reposição deste volume com meio TYI-S-33, as culturas foram resfriadas sobre gelo por 15 minutos, a fim de remover os indivíduos aderidos, determinando a população total de trofozoítos em novas alíquotas removidas da cultura. O volume foi repostado com meio TYI-S-33 e os cultivos foram reincubados. A estimativa de trofozoítas aderidos foi considerada como população total do sobrenadante. O ensaio foi realizado em 2 duplicatas independentes, determinando a inibição de crescimento em 50% dos indivíduos (IC₅₀) no Anova One-Way com p<0,001, comparando a soma de trofozoítos aderidos e não aderidos das culturas-teste à cultura-controle negativo e positivo (albendazol).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Associando procedimentos investigativos de anatomia e fisiologia vegetal, como a morfoanatomia e ensaios histoquímicos, a análise detalhada da espécie auxiliou sua caracterização. Buscando identificar, isolar e, sempre que possível, avaliar a atividade biológica de metabólitos secundários, o estudo fitoquímico foi conduzido. Estes dados poderão ser utilizados como padrão de comparação e guia de identificação para a espécie. Ensaios toxicológicos complementares foram valiosos no aspecto de desvelar atividades biológicas possíveis, relacionando aos avanços no perfil fitoquímico da espécie.

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

5.1.1 Ensaios Físico-Químicos

Os resultados obtidos nos ensaios físico-químicos realizados em *Cestrum intermedium*, expostos na TABELA 1, correspondem ao preconizado para espécies vegetais pela Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (BRASIL, 2019).

TABELA 1 – TEOR DE UMIDADE, CINZAS E DENSIDADE APARENTE DE FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*

Material Vegetal	Umidade%	Cinzas%	Densidade Aparente (g/mL)
Folhas	8,54±0,27	11,34±0,16	0,22±0,14
Cascas	8,19±0,21	5,24±0,04	0,26±0,08

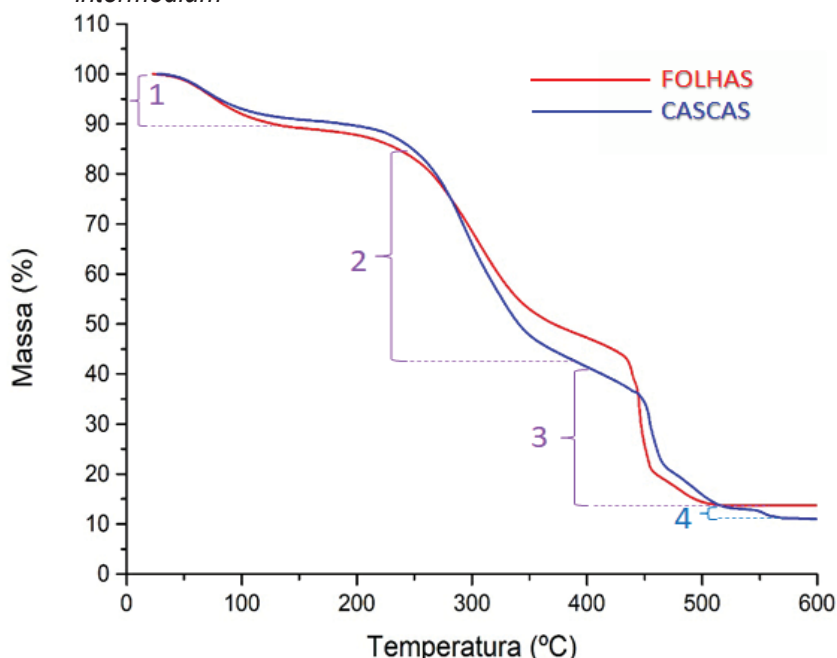
FONTE: A autora (2020)

Estes ensaios clássicos, principalmente o Teor de Umidade e Cinzas, são utilizados como controle de qualidade de drogas vegetais, conduzindo a análise preliminar de matérias-primas vegetais. Em Szabo (2014a), os ensaios físico-químicos realizados em *Cestrum intermedium* apresentaram resultados similares aos observados na TABELA 1, exceto o teor de umidade das cascas (cerca de 40% inferior). Diferentes condições ambientais como regime hídrico, estado nutricional do solo, umidade, incidência solar, entre outros, podem influenciar características físico-químicas do indivíduo (HARAGUCHI et al. 2013), refletindo nos resultados de ensaios físico-químicos, uma vez que a coleta do material vegetal ocorreu em períodos distintos.

5.1.2 Análise Termogravimétrica

Avaliando a perda de massa de folhas e cascas, o perfil de degradação de seus componentes foi evidenciado: ocorrendo em faixas de temperaturas próximas, indicou perfil de compostos similar, apesar de uma etapa adicional ocorrer nas cascas. Como observado no ensaio histoquímico (Item 5.2.3) e ensaio fitoquímico preliminar (SZABO, 2015), as folhas e cascas apresentam similaridades em sua composição. O processo de degradação do material vegetal foi expresso no GRÁFICO 1 e seus dados compuseram a TABELA 2.

GRÁFICO 1 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*



Foi observada estabilidade térmica do material vegetal até aproximadamente 160° C, uma vez que a Etapa 1 (20-160 °C) está relacionada à perda de água. Na Etapa 2 (196-396 °C), os metabólitos secundários começam a degradar correspondendo à maior perda de massa observada dentre as etapas: 41,21% das folhas e 48,50% das cascas. A Etapa 3 (393-539 °C) decompõe polímeros e resíduos carbonados, correspondendo à etapa final das folhas, com perda de massa de 34,14%.

A degradação das cascas ocorreu em uma etapa adicional, principalmente devido a seu material suberificado, que necessita de temperaturas superiores para

degradar. A Etapa 3 correspondeu à perda de 29,26% da massa das cascas, seguida da Etapa 4 (535-600 °C) com perda de 1,89% em material suberificado. Como observado na análise anatômica, o material suberificado está presente nas cascas e ausente nas folhas.

TABELA 2 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DE FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*

ETAPA	FOLHAS			CASCAS		
	T (°C)		PERDA DE MASSA (%)	T (°C)		PERDA DE MASSA (%)
1	T _i	20	10,7	T _i	20	9,29
	T _F	156		T _F	160	
2	T _i	156	41,21	T _i	160	48,50
	T _F	396		T _F	393	
3	T _i	396	34,14	T _i	393	29,26
	T _F	539		T _F	535	
4	T _i	-	-	T _i	535	1,89
	T _F	-		T _F	600	
Resíduo	T _i	600	13,95	T _i	600	11,06
	T _F	-		T _F	-	

FONTE: A autora (2020).

Legenda: T_i – Temperatura inicial; T_F – Temperatura final.

Devido à atmosfera privada de oxigênio, os resíduos carboníferos remanescentes não entram em combustão, estabilizando a massa do material. Em atmosfera oxigenada, o Resíduo Carbonífero sofreria combustão, resultando em substâncias inorgânicas não voláteis (cinzas). Ao deduzir o Teor de Cinzas (TABELA 3) do Resíduo Carbonífero, pode-se obter uma estimativa da quantidade de componentes voláteis ainda presentes: aproximadamente 3% para as folhas e 6% para as cascas.

Novamente, relacionando os resultados de TGA com a análise térmica clássica (TA) (TABELA 3), observa-se um perfil similar de perda de água. Vale ressaltar que os valores estimados são uma aproximação, uma vez que a sensibilidade dos métodos é distinta e podem apresentar variações.

TABELA 3 – ANÁLISE TÉRMICA E TERMOGRAVIMÉTRICA DE FOLHAS E CASCAS DE *Cestrum intermedium*

Amostra	Umidade%		Cinzas%
	TA	TGA	
Folhas	8,54±0,27	10,7	11,34±0,16
Cascas	8,19±0,21	9,29	5,24±0,04

FONTE: A autora (2020).

Legenda: TGA – Termogravimetria; TA – Análise Térmica.

5.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

5.2.1 Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica das partes aéreas de *Cestrum intermedium* foi observada a inserção de folhas aos ramos circulares de forma alterna, por meio de pecíolos de 14 mm em média. As folhas são glabras, medindo cerca de 3 cm de largura e 12 cm de comprimento, apresentando limbos verde-escuros, mais claros na face adaxial, de textura macia (FIGURA 19). Pode-se observar a característica marcante que dá nome ao gênero: folhas em forma de dardos (do grego: *kestron*). Esta análise é similar à reportada por Vignoli-Silva (2009) e Kissmann e Groth (2000).

FIGURA 19 – RAMOS RECÉM-COLETADOS DE *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020).

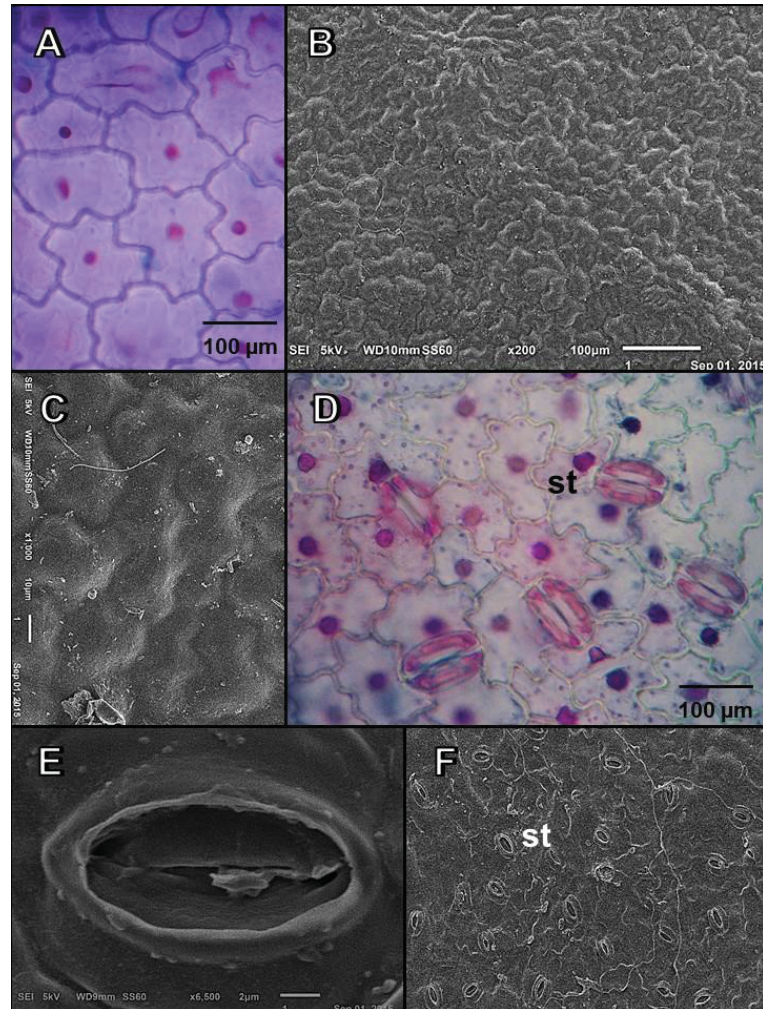
5.2.2 Avaliação microscópica

5.2.2.1 Folhas de *Cestrum intermedium*

Em visão frontal, a face adaxial da lamina foliar apresenta epiderme com células de contorno ondulado e paredes delgadas (FIGURA 20 A), conferindo-lhe aspecto sinuoso (FIGURA 20 B), sendo revestida por uma fina camada de cutícula levemente estriada (FIGURA 20 C). Apresentando o aspecto irregular da face adaxial (20 D e F), a face abaxial revela a presença de estômatos anomocíticos (3,0-5,0 μm)

(20 E e F). As folhas de *Cestrum intermedium* foram caracterizadas como glabras e hipoestomáticas.

FIGURA 20 – FOLHA DE *Cestrum intermedium* EM VISÃO FRONTAL



FONTE: A autora (2020)

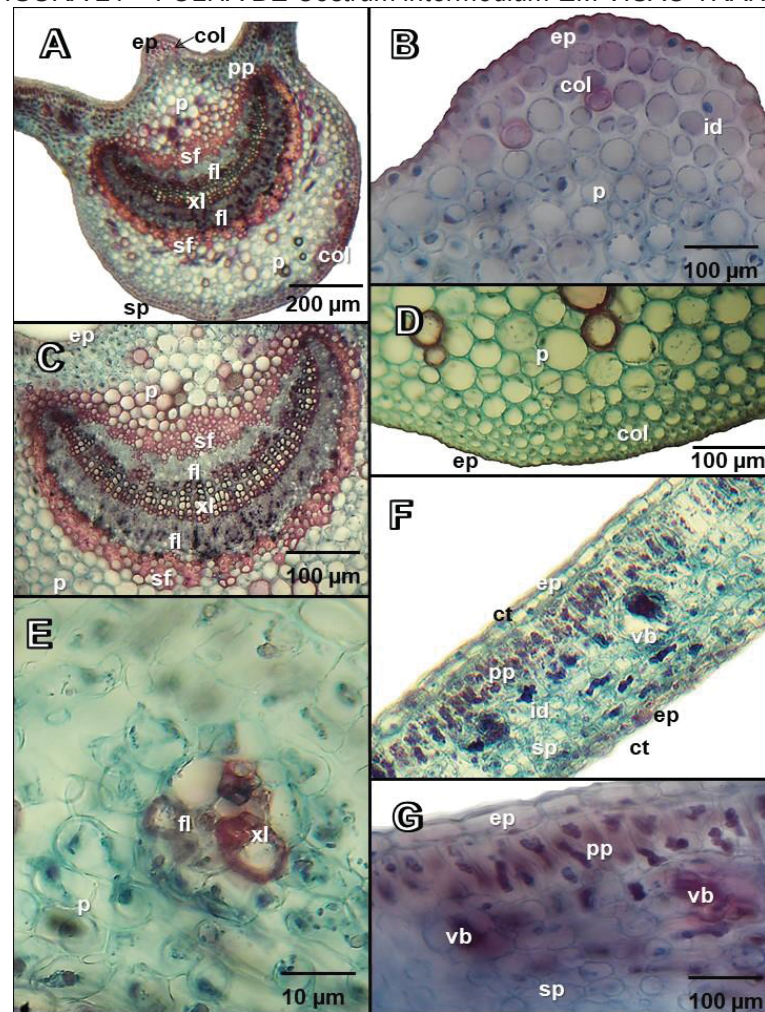
Legenda: A, B- Folha em visão frontal (face adaxial). C- Pormenor da epiderme demonstrando a cutícula ondulada e levemente estriada. D- Visão geral dos estômatos (face abaxial). E- Detalhe do estômato. F- Aspecto irregular da epiderme abaxial e presença de estômatos.

Nota: st -estômato.

Em secção transversal, a lamina foliar apresenta epiderme unisseriada com células quadrangulares, células secretoras e ausência de tricomas (FIGURA 21 A e F). A região intranervural apresenta contorno biconvexo, epiderme com células anticlinais sutilmente maiores na face adaxial (FIGURAS 21 B e D) e fibras de células esclerenquimáticas rodeando o feixe vascular bicolateral fechado. O parênquima (6-8 fileiras de células) é seguido de colênquima angular, mais espesso na face abaxial (2-4 fileiras de células). Outra característica de destaque da face abaxial são parênquima sobre fibras e floema mais largo, intercalado com camadas xilema (FIGURAS 21 A,

B, C e D). A região do mesofilo dorsiventral apresenta parênquima paliçádico unisseriado com células ligeiramente mais alongadas que as encontradas no parênquima esponjoso (3-4 fileiras), composto por células globosas, relativamente compactas (FIGURAS 21 F e G). Também estão presentes feixes vasculares do tipo colateral fechado, onde observa-se xilema e floema secundários intercalados, cercados por bainha de células esclerenquimáticas (FIGURAS 21 E, F e G).

FIGURA 21 – FOLHA DE *Cestrum intermedium* EM VISÃO TRANSVERSAL



FONTE: A autora (2020)

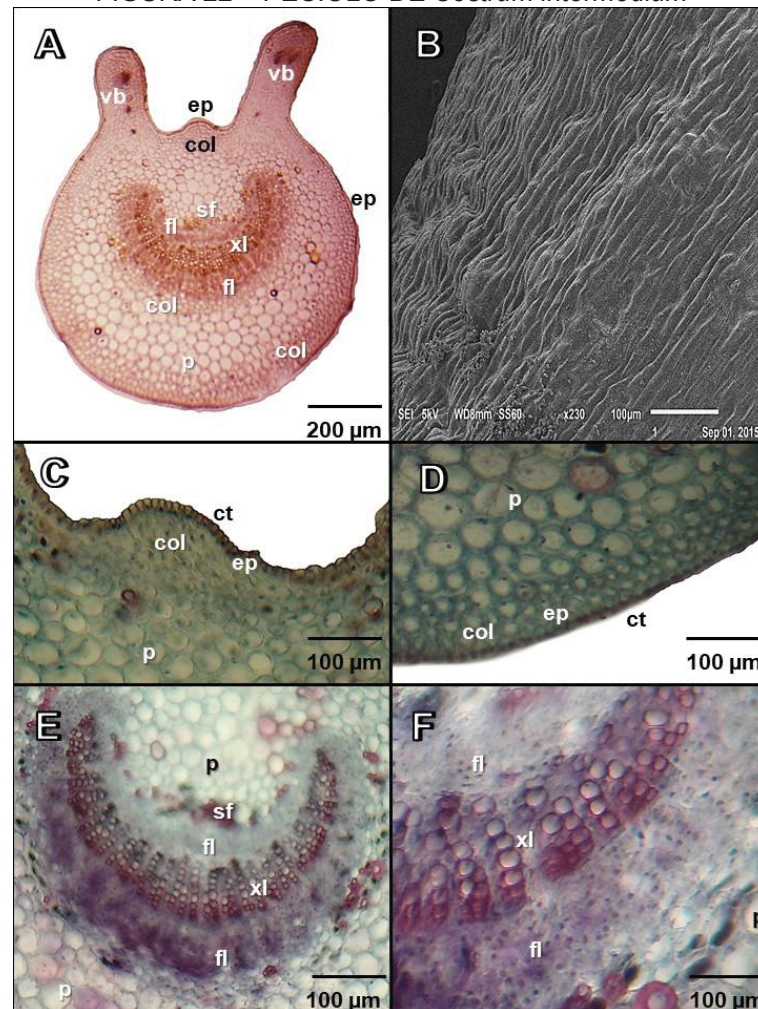
Legenda: A - Aspecto Geral. B, D- Detalhe da epiderme e do colênquima contendo idioblastos. C- Detalhe da nervura central. E- Detalhe do mesofilo demonstrando o feixe vascular de médio porte. F- Mesofilo dorsiventral demonstrando células do parênquima paliçádico e esponjoso, contendo idioblastos. G- Detalhe da epiderme.

Nota: ep- epiderme, col- colênquima, p-parênquima, pp- parênquima paliçádico, sp- parênquima esponjoso, sf- fibras de esclerenquima, id- idioblastos, ct- cutícula, xl- xilema, fl- floema, vb – feixe vascular.

O pecíolo apresenta formato circular e periderme com bordas irregulares, assumindo aspecto plissado (FIGURAS 22 A e B). A epiderme é unisseriada, com aspecto semelhante à nervura central foliar, apresenta parênquima com paredes

espessas e substâncias de reserva isoladas e em grupos, com pontuações evidentes ao lado do feixe vascular (FIGURAS 22 C e D). Na região da nervura central, é observado um feixe vascular de formato bicolateral fechado em formato de arco, com poucas células esclerenquimáticas ao redor de ambas as faces do floema. O floema se mostra mais abundante na face abaxial, intercalando-se entre o xilema, caracterizado por ser menos abundante (9 fileiras) (FIGURAS 22 E e F).

FIGURA 22 – PECÍOLO DE *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020)

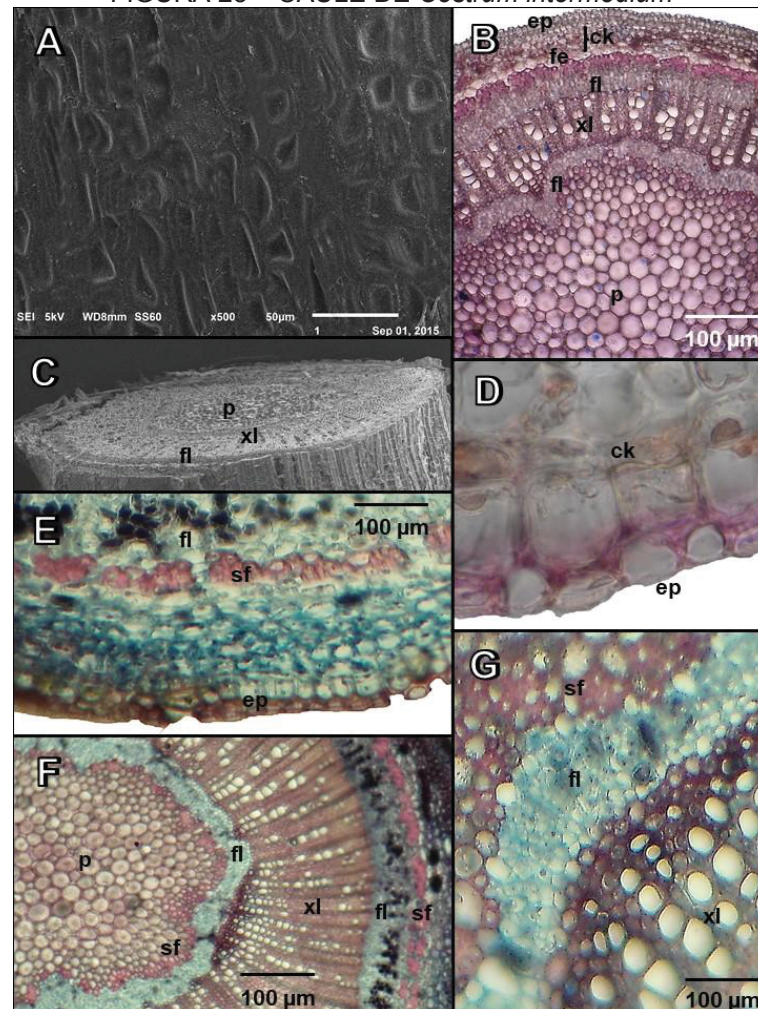
Legenda: A- Aspecto geral. B- Detalhe da epiderme demonstrando formato irregular. C, D- Detalhe da epiderme e do colênquima. E- Detalhe do feixe vascularcolateral em formato de arco. F- Detalhe do feixe vascular demonstrando o xilema intercalado com floema. Nota: ep- epiderme, col- colênquima, p- parênquima, sf- fibras de esclerenquima, fl- floema, ct- cutícula, xl- xilema.

5.2.2.2 Caules de *Cestrum intermedium*

O caule apresenta cascas irregulares, crescimento secundário inicial e formato circular em secção transversal (FIGURAS 23 A, B e C). Coberta de cutícula

ornamentada, a epiderme unisseriada repousa diretamente sobre o súber, formado por felogênio. O súber apresenta células mais altas na periferia do caule, seguido de uma pequena camada de feloderme (FIGURAS 23 B e D). Logo abaixo, é possível observar poucas células de colênquima angular justapostas ao parênquima cortical, envoltas por fibras de esclerênquima (FIGURAS 23 B e E). A região do cilindro vascular possui uma extensa camada de xilema secundário envolto por duas camadas de floema. É possível observar células parenquimáticas na camada mais externa do floema (FIGURA 23 F). Abaixo da camada interna de floema, células esclerenquimáticas circundam o parênquima medular, constituído por células relativamente grandes e pouco lignificadas (FIGURA 23 F e G).

FIGURA 23 – CAULE DE *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020)

Legenda: A- Aspecto geral da epiderme de formato irregular. B- Caule em secção transversal. C- Detalhe do caule em MEV, demonstrando a arquitetura anatômica do caule. D- Detalhe da epiderme ornamentada. F- Detalhe do feixe vascular demonstrando o xilema com traqueídes, floema bilateral e fibras esclerenquimáticas.

Nota: ep- epiderme, col- colênquima, p- parênquima, sf- fibras de esclerênquima, fl- floema, id- idioblastos, ct- cutícula, xl- xilema, fe- feloderme, ck- suber

A anatomia de *Cestrum intermedium* possui semelhanças com outras espécies do gênero encontradas em literatura (COSA, 1994; LISCOVSKY; COSA, 2005; JÁUREGUI et al., 1998, JÁUREGUI et al., 2000; JÁUREGUI; BENÍTEZ, 2007; GALLEGO, 2011). Dentre estas características, destaca-se a epiderme unisseriada e a presença de estômatos na face abaxial, demonstrando que estas espécies são características de zonas com ambientes úmidos e condições de grande luminosidade, uma vez que a ausência de estômatos na face adaxial está associada a um mecanismo para controle de água pela planta (LARCHER, 1986).

Além disso, a característica da nervura na folha e a presença de feixe bicolateral central em formato de arco trata-se de uma característica comum dentro do gênero, observada por Jáuregui et al. (2000). A presença de cutícula ornamentada no caule também é comum na espécie *C. humboldtii* (AHMAD, 1964), *C. auranticum* e *C. diurnum* (JÁUREGUI; BENÍTEZ, 2007). *C. pariense* e *C. megalophyllum* são as únicas espécies que apresentam células esclerificadas no mesófilo (JÁUREGUI et al., 2000) sendo que esta característica também não ocorre para a espécie *C. intermedium*.

De maneira geral, tricomas são uma característica importante para diferenciação de espécies, também aplicando-se às espécies de *Cestrum* (GALLEGO, 2011): *Cestrum intermedium* é glabra como *C. parqui* (SOARES, 2006) e *C. glabrum*, porém muitas espécies apresentam tricomas (GALLEGO, 2011), como em *C. diurnum* e *C. nocturnum*, com tricomas ramificados (JÁUREGUI; BENÍTEZ, 2007). Outra característica de distinção é a espessura da parede celular da epiderme, geralmente engrossada como observado em *C. diurnum* e *C. nocturnum*, mas delgada em *C. jaramillanum* (JÁUREGUI; BENÍTEZ, 2007) e *C. intermedium*. A TABELA 4 compara *Cestrum intermedium* a outras espécies de *Cestrum*.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DE *Cestrum intermedium* A OUTRAS ESPÉCIES *Cestrum* DESCRITAS EM LITERATURA

FOLHA					PEÇÍOLO			CAULE			
Epiderme	Estômatos	Cutícula	Feixe Vascular	Tricomas	Epiderme	Feixe Vascular	Tricomas	Epiderme	Cutícula	F. Vascular	Tricomas
C. intermedium	Uniseriada; Células quadradas; Ondulada;	Fina; Estriada; mais espessa na face adaxial;	Formato de C (nervura central)	Ausentes;	Uniseriada;	Formato de C; Bicolateral;	Ausentes;	Uniseriada;	Estriada;	Bicolateral;	Ausentes;
C. diurnum	Uniseriada; Células externas alongadas; Nishtha <i>et al.</i> (2017) Quadradas e retangulares; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Espessa; Ornamentada na face adaxial; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Bicolateral aberto; Oval; Nishtha <i>et al.</i> (2017) Colateral fechado; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Glandular na face abaxial; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Uniseriada; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Bicolateral fechado; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Escassos; Glandular; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Uniseriada; Retangular; Nishtha <i>et al.</i> (2017)	-	Bicolateral; Nishtha <i>et al.</i> (2017)	-
C. nocturnum	Uniseriada; Nishtha <i>et al.</i> (2017) Uniseriada; Principalmente retangular; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Espessa; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007) Suave; Liscovsky and Cosa (2005)	Plano-convexo Aberto; Nishtha <i>et al.</i> (2017) Colateral fechado; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Glandular; Mais escassos na face adaxial; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Uniseriada; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	Bicolateral fechado; Jáuregui and Benítez <i>et al.</i> (2007)	-	Uniseriada; Nishtha <i>et al.</i> (2017)	-	Bicolateral; Nishtha <i>et al.</i> (2017)	-
C. amictum	-	Suave; Liscovsky and Cosa (2005)	-	Glandular; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-	-	Uniseriada; Liscovsky and Cosa (2005)	Uniseriada; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-
C. laevigatum	-	Suave; Liscovsky and Cosa (2005)	-	Glandular; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-	-	Uniseriada; Liscovsky and Cosa (2005)	Estriada; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-
C. parqui	-	Estriada; Liscovsky and Cosa (2005)	-	Glandular; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-	-	Uniseriada; Liscovsky and Cosa (2005)	Estriada; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-
C. sendtnerianum	-	Suave; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-	-	-	-	Uniseriada; Liscovsky and Cosa (2005)	Fina; Liscovsky and Cosa (2005)	-	-

FONTE: A autora (2020)

5.2.3 Testes Histoquímicos

Os testes histoquímicos revelaram a presença de diferentes substâncias: proteínas totais, polissacarídeos neutros, alcaloides, terpenoides, lignina e grupos carbonila. Foi observada a presença de proteínas totais ao redor das células de xilema na região da nervura foliar e pecíolo (FIGURA 24 - 1A e 2A) e caule, também ocorrendo no interior de células do floema e parênquima angular (FIGURAS 24 - 3A e 3B). A presença de polissacarídeos neutros foi observada no xilema e epiderme da lamina foliar (FIGURAS 24 - 1B e 1C), no xilema do pecíolo (FIGURA 24 - 2B e 2C) e em maior quantidade no xilema, fibras e parênquima medular do caule (FIGURA 24 - 3C).

Os testes realizados para detecção de alcaloides demonstraram reação positiva nos dois métodos empregados (Dragendorff e Bertrand) em folhas, pecíolos e caules. Nas folhas, a presença de alcaloides foi observada nas células de parênquima próximas ao floema. Apenas o método de Dragendorff evidenciou a presença de alcaloides entre as células do xilema, fibras de esclerênquima, feixes vasculares secundários e em algumas células do parênquima esponjoso (FIGURAS 24 - 1D, 1E, 1F e 1G). No pecíolo, a reação para alcaloides foi positiva nas células do parênquima, fibras de esclerênquima e alguns polos de xilema (FIGURAS 24 - 2D, 2E e 2F). A presença de alcaloides no caule foi observada em maior quantidade nos idioblastos das células do parênquima e, em menor quantidade, nas fibras esclerenquimáticas (FIGURAS 24 - 3D, 3E, 3F e 3G).

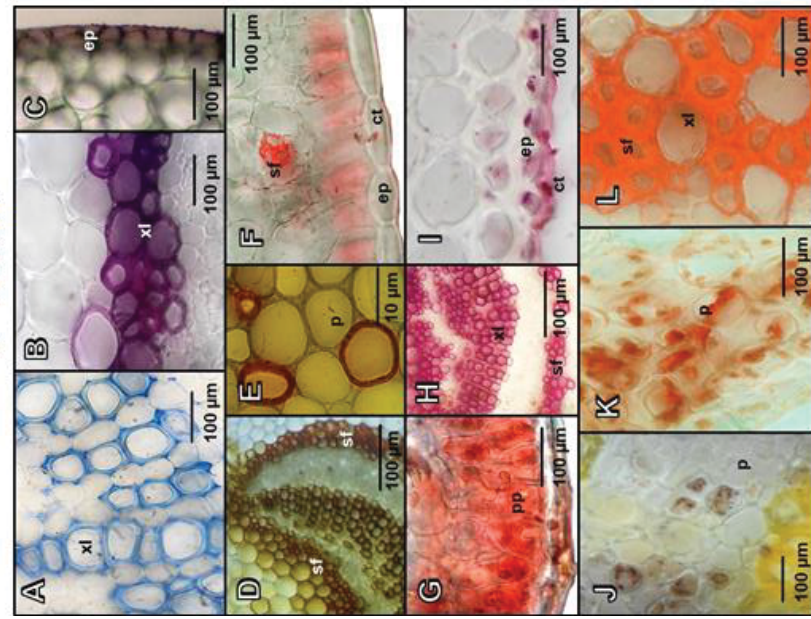
Células com lignina foram observadas em fibras e xilema das folhas e caules e xilema do pecíolo. A epiderme do caule mostra a presença de cutícula externa à epiderme, sendo bastante lignificada (FIGURAS 24 - 1I, 2G, 3H e 3I). Lipídios foram detectados em células da epiderme foliar (FIGURA 24 - 1I), pecíolo (FIGURA 24 - 2J) e endoderme do caule (FIGURA 24 - 3J). Grãos de amido foram observados no parênquima do caule e pecíolo (FIGURAS 24 - 1J, 2H), sendo abundantes no parênquima medular do caule (FIGURA 24 - 3K). A presença de terpenoides com grupo carbonila foi observada no parênquima, fibras e células de xilema da folha (FIGURAS 24 - 1K e 1L), pecíolo (FIGURAS 24 - 2I e 2K) e parênquima medular do caule (FIGURA 24 - 3L).

FIGURA 24 – ENSAIOS HISTOQUÍMICOS EM FOLHA, PECÍOLO E CAULE DE *Cestrum intermedium*

1 - FOLHA

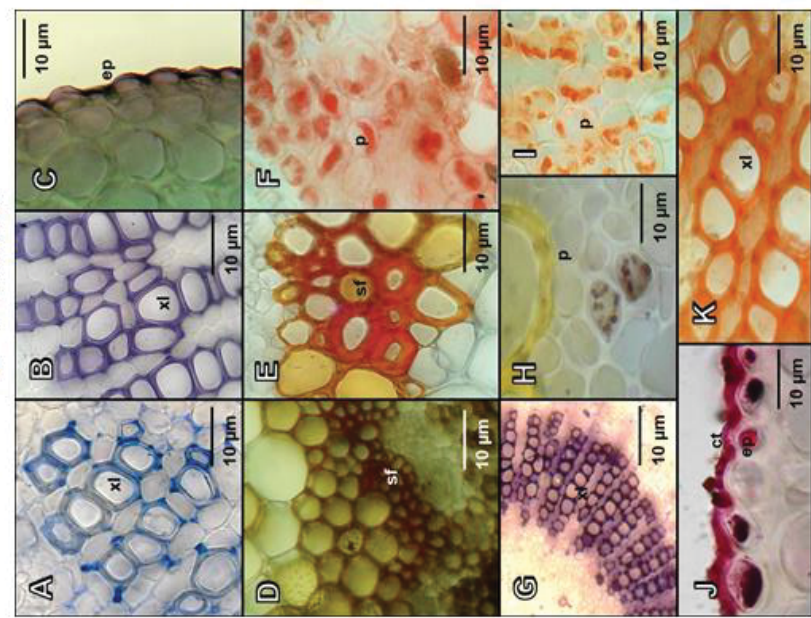
2 - PECÍOLO

3 - CAULE



LEGENDA: A- Teste positivo para proteínas totais (Azul Brilhante de Coomassie). B, C- Teste positivo para polissacarídeos neutros (PAS - Ac. Periódico/R. de Schiff). D, E- Teste positivo para alcalóides (método de Dragendorff). F, G- Teste positivo para alcalóides (método de Bertrand). H - Teste positivo para presença de lignina (Floroglucinol-HCl). I- Teste positivo para a presença de lipídios (SUDAM III). K, L - Teste positivo para terpenóides (2,4-dinitrofenil-hidrazina)

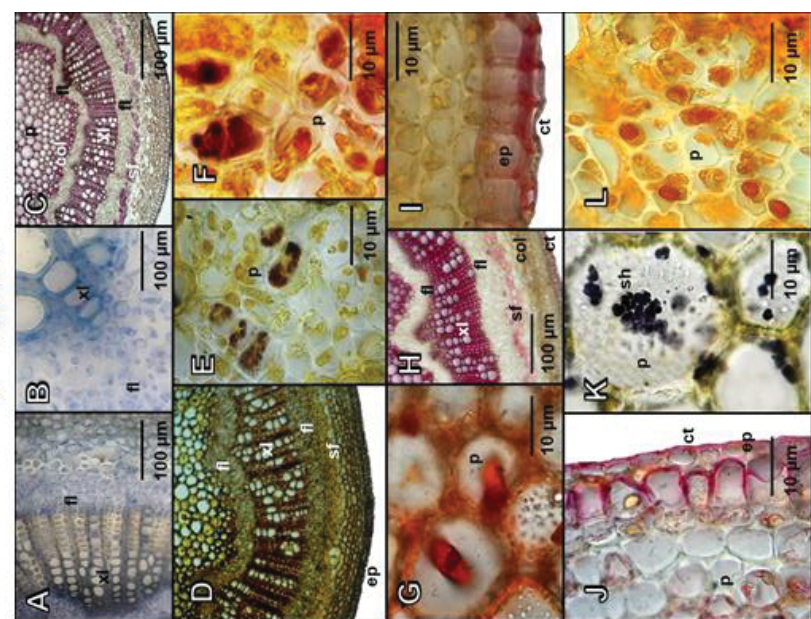
NOTA: ep- epiderme, p-parênquima, sf- fibras de esclerênquima, ct- cutícula, xl- xilema.



FONTE: A Autora (2020).

LEGENDA: A- Teste positivo para proteínas totais (Azul Brilhante de Coomassie). B, C- Teste positivo para polissacarídeos neutros (PAS-Ac. Periódico/R. de Schiff). D- Teste positivo para alcalóides (método de Dragendorff). E, F- Teste positivo para alcalóides (método de Bertrand). G- Teste positivo para presença de lignina (Floroglucinol-HCl). H- Grãos de amido (lugol). I, K- Teste positivo para terpenóides (2,4-dinitrofenil-hidrazina). J-Teste positivo para a presença de lipídios (SUDAM III).

NOTA: ep- epiderme, p-parênquima, sf- fibras de esclerênquima, ct- cutícula, xl- xilema.



Legenda: A, B- teste positivo para proteínas totais (Azul Brilhante de Coomassie). C- Teste positivo para polissacarídeos neutros (PAS-Ac. Periódico/R. de Schiff). D, E- Teste positivo para alcalóides (método de Dragendorff). F, G- Teste positivo para alcalóides (método de Bertrand). H, I- Teste positivo para presença de lignina (Floroglucinol-HCl). J- Teste positivo para a presença de lipídios (SUDAM III). K- Grãos de amido (Lugol). L- Teste positivo para terpenóides (2,4-dinitrofenil-hidrazina).

Nota: ep- epiderme, p-parênquima, sf- fibras de esclerênquima, ct- cutícula, xl- xilema, sh- amido.

O ensaio histoquímico em *Cestrum intermedium* revelou marcadores da espécie, trazendo à luz marcadores quimiotaxonômicos da família Solanaceae (alcaloides), contribuindo com dados para a discussão sobre a toxicidade em gado. A TABELA 5 reúne os achados histoquímicos em *Cestrum intermedium*, destacando os resultados encontrados anteriormente no único ensaio sistemático realizado com extratos de *Cestrum intermedium* (SZABO et al., 2014a)

TABELA 5 – COMPOSTOS DETECTADOS NO ENSAIO HISTOQUÍMICO EM *Cestrum intermedium*

Grupo Químico	Folha	Pecíolo	Caule
Proteínas Totais	+	+	+
Polissacarídeos Neutros	+	+	+
<i>Alcaloides</i>	+	+	+
Compostos Esteroidais	+	+	+
Lignina	+	+	+
Lípideos Totais	+	+	+
Amido	+	+	+
<i>Terpenoides com grupo Carbonila</i>	+	+	+

FONTE: A autora (2020)

Legenda: (+) positivo

Nota: Linhas sombreadas destacam os achados do perfil fitoquímico em Szabo (2014a).

Devido à complexa taxonomia de *Cestrum* e desafios para distinção entre espécies (SOARES et al., 2006), o detalhamento de características anatômicas e histoquímicas de *Cestrum intermedium* podem auxiliar na identificação de indivíduos. O estudo morfoanatômico e histoquímico configura valiosa estratégia: manobras de identificação consistem em chaves taxonômicas, que exigem presença de flores e frutos para uso adequado, restringindo o reconhecimento de espécies.

5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Estudos fitoquímicos preliminares usualmente submetem o material vegetal a sucessivas extrações com solventes de diferentes características, distribuindo seus constituintes químicos de acordo com sua polaridade. Segregando os metabólitos de acordo com sua polaridades (como descrito no item 4.3), estima-se encontrar lipídeos, ceras e pigmentos na fração hexano; bases livres de alcaloides e antraquinonas livres na fração clorofórmio; flavonoides e cumarinas simples na fração acetato de etila; e saponinas, taninos, alcaloides e heterosídeos em geral na fração remanescente (CHOZE, 2004).

Aplicando este raciocínio, as diferenças esperadas entre os extratos brutos cetônicos e pós-cetônicos (etanólicos), devido ao gradiente de polaridade entre estes solventes, puderam ser avaliadas. A determinação de rendimento e teor de sólidos destes extratos refletiram características distintas, não limitadas apenas à quantidades, como discutido no Item 5.4.5.

O teor de sólidos e rendimento dos extratos cetônicos e pós-cetônicos das folhas e cascas de *Cestrum intermedium* são resultados inéditos, não havendo parâmetros comparativos. O teor de sólidos (TABELA 6) e rendimento dos extratos (TABELA 7) podem ser empregados como padrão comparativo futuramente e indicam as diferentes constituições entre si.

TABELA 6 – TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO CETÔNICO E PÓS-CETÔNICO DE *C. intermedium*

Amostra	Teor de Sólidos (g/mL)	
	Extrato Cetônico	Extrato Pós-Cetônico
Folhas	0,0090	0,0053
Cascas	0,0065	0,0245

FONTE: A autora (2020)

TABELA 7 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS CETÔNICO E PÓS-CETÔNICO DE *C. intermedium*

Amostra	Rendimento (%)	
	Extrato Cetônico	Extrato Pós-Cetônico
Folhas	5,26	2,65
	1,42	7,23
Cascas	1,42	7,23
	7,23	

FONTE: A autora (2020)

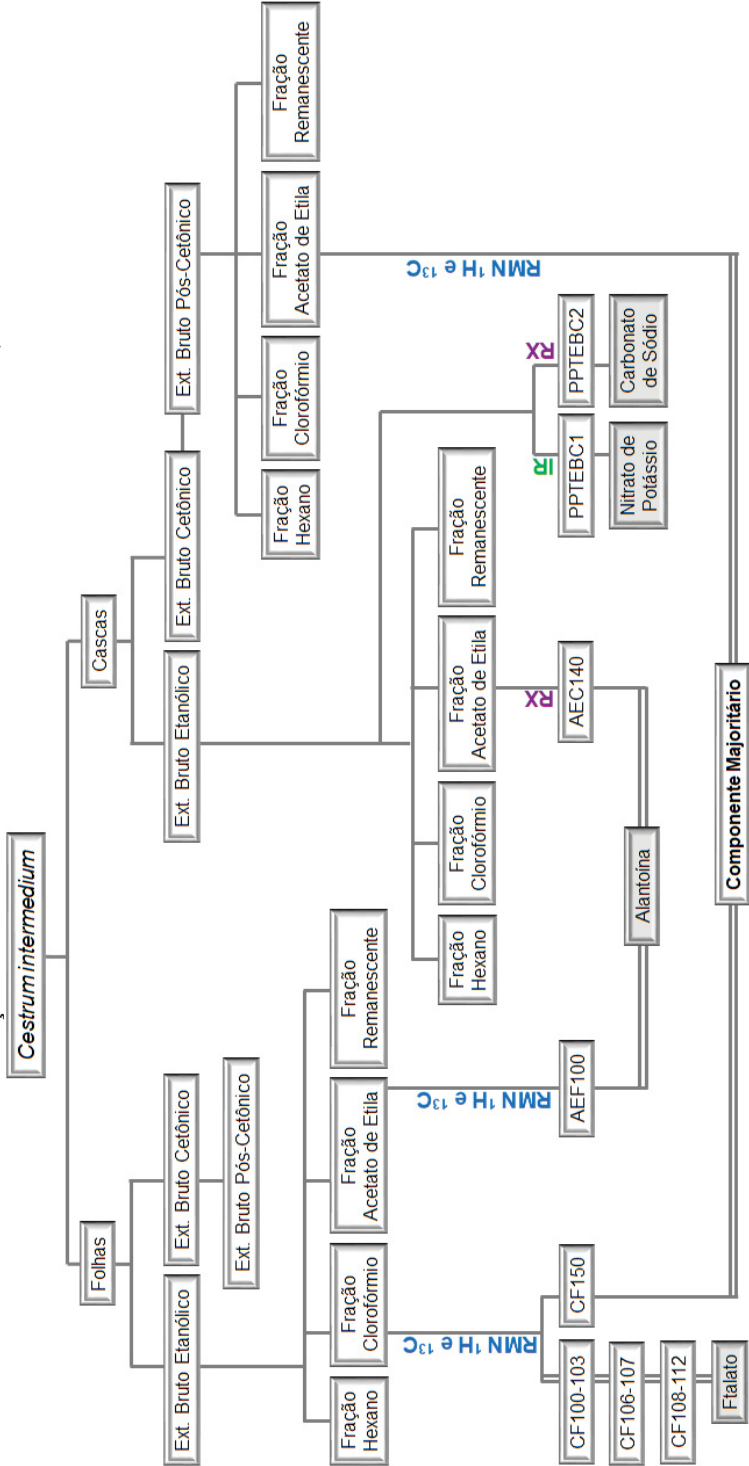
Comparando o rendimento dos extratos brutos, pode-se observar significativa diferença: nas folhas, o rendimento do extrato cetônico é praticamente o dobro do extrato etanólico pós-cetônico; nas cascas, o rendimento do extrato etanólico pós-cetônico é cerca de cinco vezes superior ao extrato cetônico. Fica evidente que a extração subsequente com solventes de variadas polaridades proporciona a obtenção de extratos com características distintas.

Sob a mesma perspectiva, ao compará-los aos extratos brutos etanólicos obtidos em Szabo (2015) (cerca de 15% para as folhas e 11% para as cascas), as diferentes características ficam ainda mais evidentes. Além disso, o extrato etanólico obtido após extração cetônica promoveu a precipitação do componente majoritário (MAJ), o que não foi observado anteriormente no extrato bruto etanólico.

5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

Como abordado anteriormente, o estudo fitoquímico foi realizado em diferentes materiais obtidos de *Cestrum intermedium*: além dos extratos brutos etanólicos de folhas e cascas (EBF e EBC) e suas frações, os extratos brutos cetônicos e pós-cetônicos (etanólicos) e suas frações foram incluídos às matrizes processadas. As origens das amostras obtidas a partir das matrizes aqui discutidas estão resumidas no fluxograma seguir (FIGURA 25).

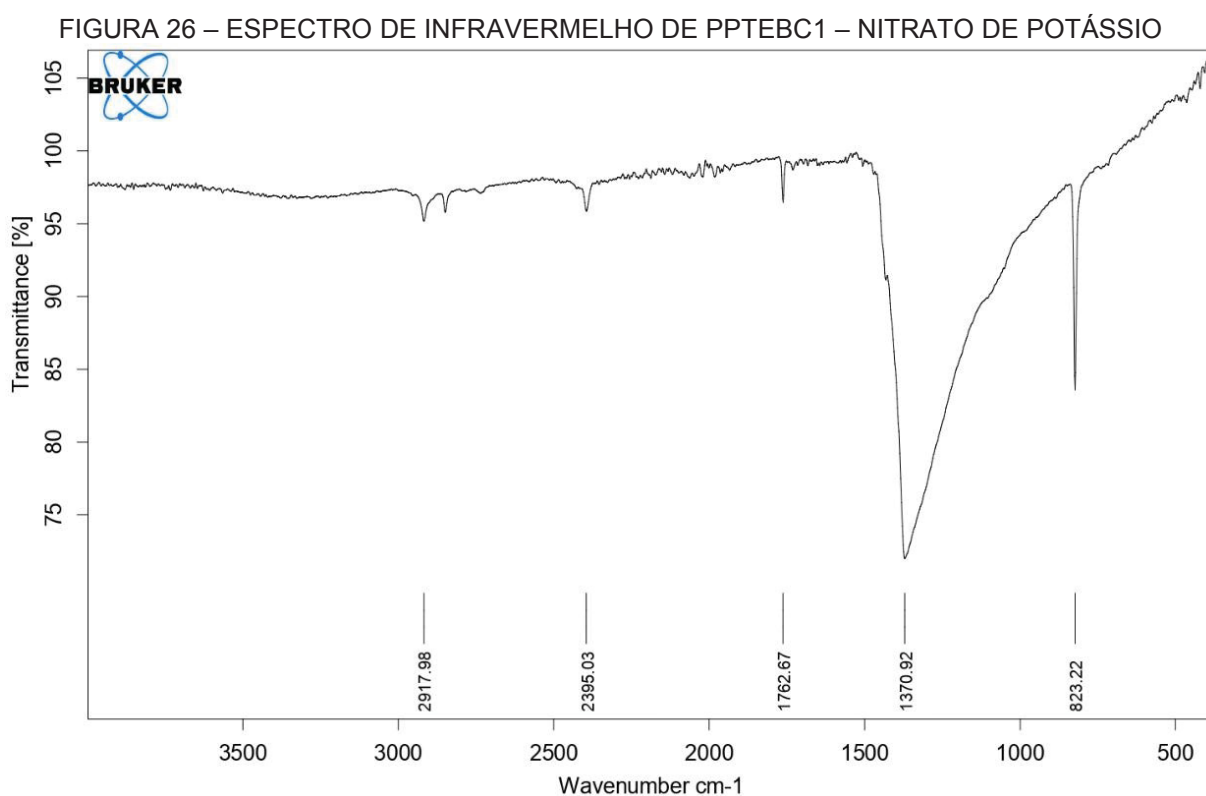
FIGURA 25 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS NO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Cestrum intermedium*



FONTE: A autora (2020).

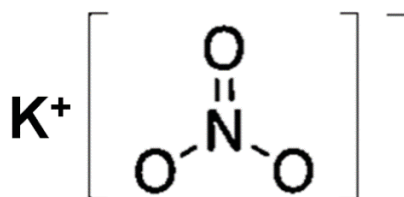
5.4.1 Amostra PPTEBC1 – Nitrato de Potássio

A amostra PPTEBC1 (sólido cristalino branco), isolada diretamente do extrato bruto etanólico das cascas de *Cestrum intermedium* no processo de filtragem, foi analisada em espectroscopia de infravermelho. O espectro de infravermelho da amostra PPTEBC1 (FIGURA 26) apresenta bandas similares ao sal inorgânico Nitrato de Potássio (FIGURA 27), quando comparadas às encontradas em literatura para a referida substância (MILLER; WILKINS, 1952) (TABELA 8). Os sinais sobressalentes ($2395,03$ e $2917,98\text{ cm}^{-1}$) podem ser atribuídos a contaminantes, possivelmente traços de PPTEBC2.



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 27 – ESTRUTURA QUÍMICA DO NITRATO DE POTÁSSIO



FONTE: A autora (2020).

TABELA 8 – BANDAS CARACTERÍSTICAS DE NITRATO DE POTÁSSIO EM INFRAVERMELHO

BANDAS KNO₃ (cm⁻¹)	
MILLER; WILKINS (1952)	PPTEBC1
824	823,22
1380	1370,92
1767	1767,67

FONTE: A autora (2020).

O nitrato de potássio (KNO₃) é um sal inorgânico largamente empregado na agricultura como fertilizante, na indústria para fabricação de vidro, fogos de artifício, explosivos, em alimentos como conservante, realçador de cor e em dentifrícios como agente dessensibilizador (PNA, 2019). Apesar de ampla aplicação, está relacionado a diversas propriedades tóxicas, normalmente associadas a elevadas concentrações. Os efeitos potencialmente tóxicos mais comumente citados são: produção de nitrosaminas, amplamente reportadas como cancerígenas, quando em contato com proteínas em meio ácido (como o estômago) ou pela atividade de bactérias encontradas no intestino; metahemoglobinemia; além de efeitos mais severos que podem acarretar em morte (PUBCHEM, 2020a).

5.4.2 Amostra PPTEBC2 – Carbonato de sódio dihidratado

A amostra PPTEBC2 (sólido cristalino branco), isolada diretamente do extrato bruto etanólico das cascas no processo de filtragem, foi analisada por difração de raios-X para determinar seus parâmetros cristalinos. Os parâmetros de célula unitária encontrados (TABELA 9) foram comparados com dados da literatura, utilizando a base de dados do CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), sendo identificado como Carbonato de Sódio Dihidratado.

TABELA 9 – PARÂMETROS OBTIDOS EM DIFRAÇÃO DA AMOSTRA PPTEBC2

PARÂMETROS	RESULTADOS
Sistema cristalino	Ortorrômbico P
a	5,42 Å
b	6,44 Å
c	9,17 Å
alfa = beta = gama	90°
Volume	320 Å ³

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Temperatura de análise - 300 K; Fonte utilizada na análise - Molibdênio K α

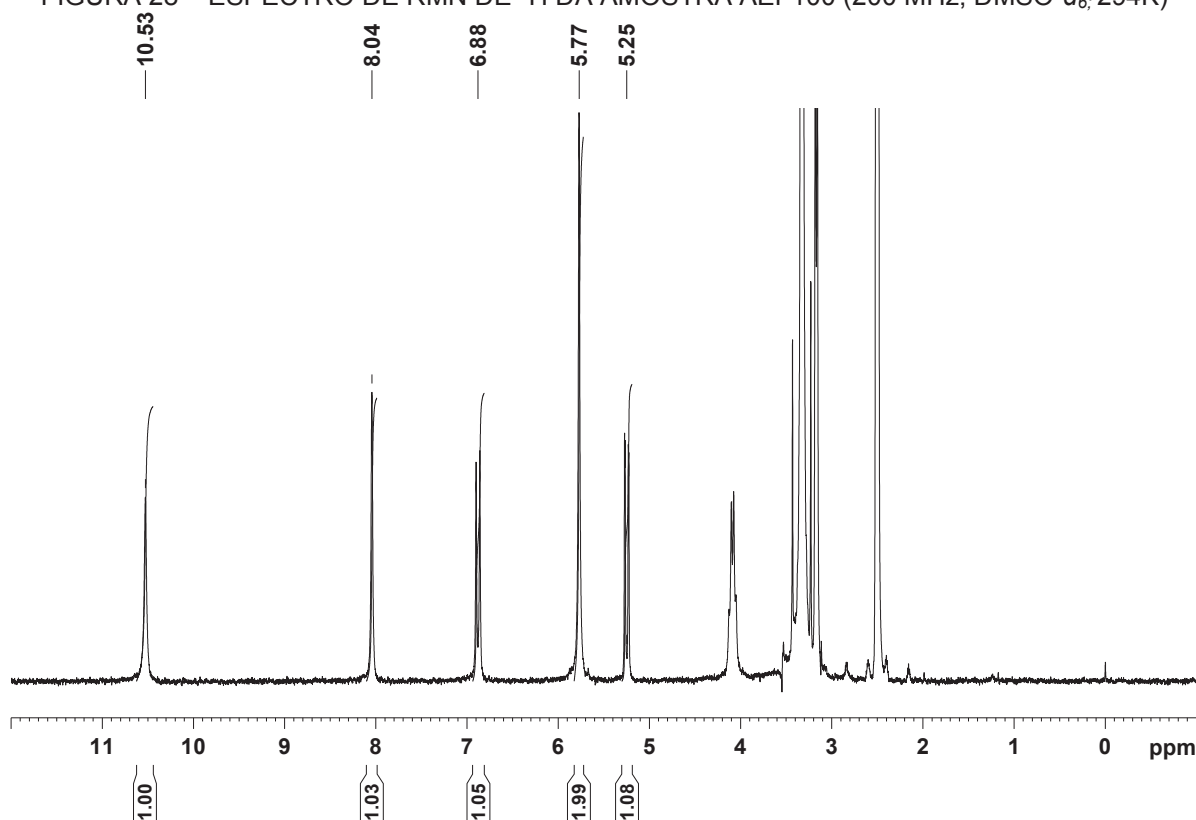
O carbonato de sódio apresenta bandas em infravermelho que se aproximam aos sinais sobressalentes observados no espectro de infravermelho de PPTEBC1),

podendo-se atribuir estes sinais à dificuldade de eliminar sua presença da amostra PPTEBC1. Esta interferência não ocorreu na análise de PPTEBC2 pois o preparo da amostra consiste na seleção de um único cristal para análise, diferente de PPTEBC1, analisada diretamente no equipamento, sem recristalização prévia.

5.4.3 Amostra AEF100 – Alantóina

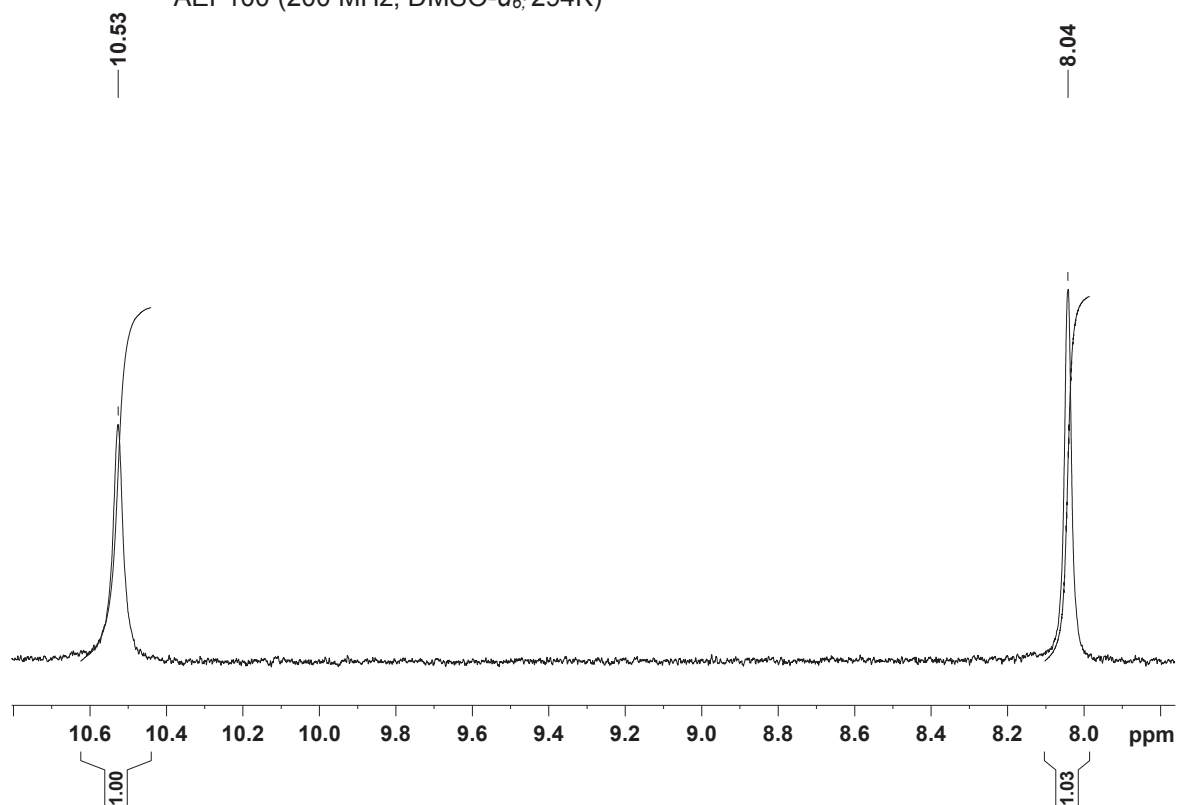
A amostra AEF100 (cristais em formato de ráfides e estrelas), isolada a partir de cromatografia em coluna da fração acetato de etila das folhas do extrato bruto etanólico, foi analisada a partir dos dados espectrais de RMN de ^1H (FIGURAS 28, 29 e 30) e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ($\text{DMSO}-d_6$) e (FIGURA 31). Ao comparar aos dados já descritos em literatura Ferreira et al. (2000) (TABELA 10), revelou se tratar de uma substância nitrogenada, conhecida como alantóina (FIGURA 32).

FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AEF100 (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$, 294K)



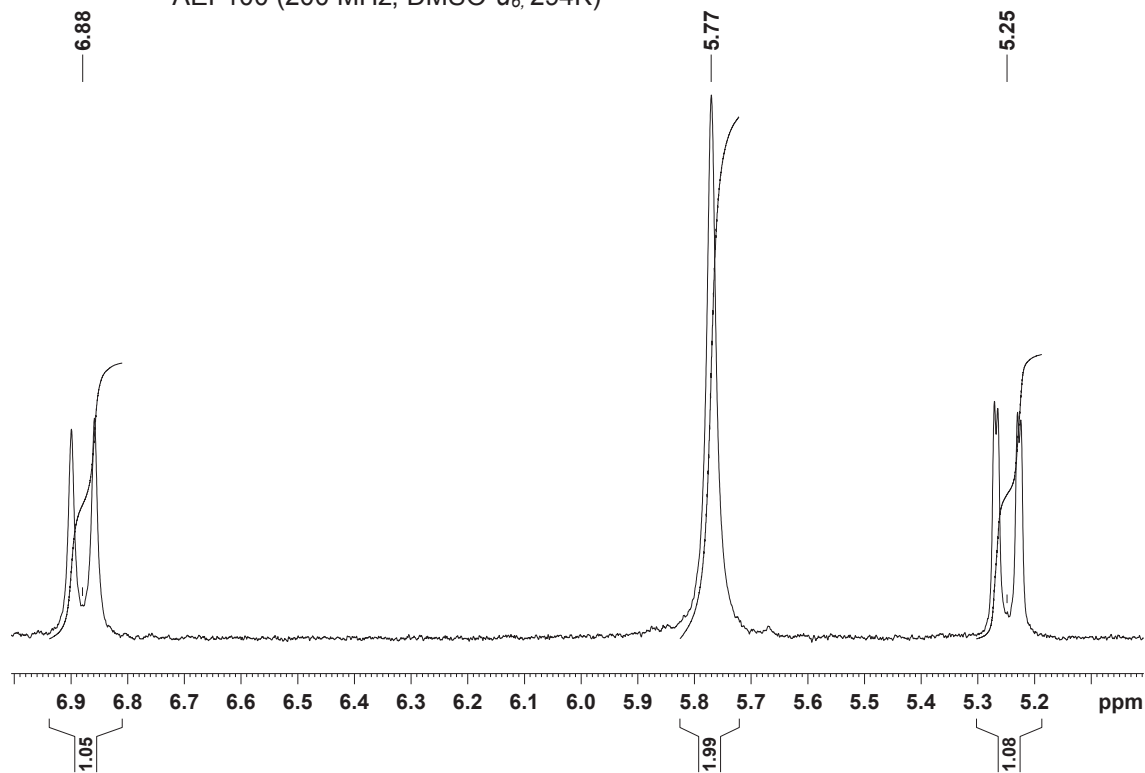
FONTE: A autora (2020).

FIGURA 29 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 11,0-8,50 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA AEF100 (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)

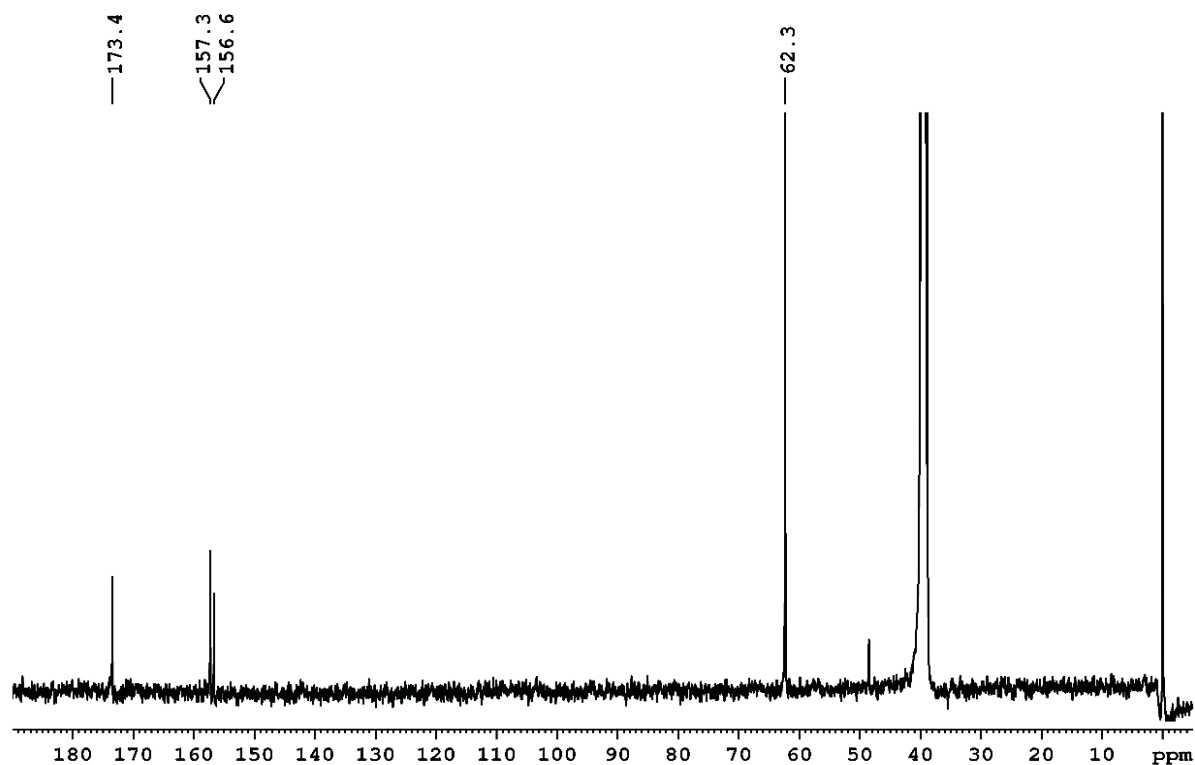


FONTE: A autora (2020).

FIGURA 30 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,0-5,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA AEF100 (200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA AEF100 (50 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)

FONTE: A autora (2020).

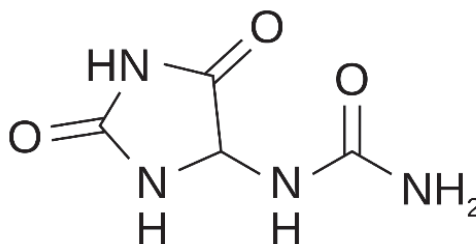
TABELA 10 – DADOS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (200 E 50 MHz, RESPECTIVAMENTE) DA AMOSTRA AEF100 EM $\text{DMSO}-d_6$ A 294K

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult (J in Hz)		$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	
	AEF100	FERREIRA et al. (2000)	AEF100	FERREIRA et al. (2000)
1	10,53 s	10,54 s		
2			157,3	157,7
3	8,04 s	8,05 s		
4			173,4	173,4
5	5,25 dd (8,1; 1,2)	5,21 d (8,1)	62,3	62,65
6	6,88 d (8,1)	6,91 d (8,1)		
7			156,6	156,7
8	5,77 s	5,82 s		

FONTE: A autora (2020).

Legenda: ^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

FIGURA 32 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ALANTOÍNA



FONTE: A autora (2020).

No espectro de RMN de ^1H foi possível observar a presença de três simpletos largos correspondentes aos grupos HN-1 (δ_{H} 10,52), HN-3 (δ_{H} 8,03) e H2N-8 (δ_{H} 5,76), além de um duplo dubleto em δ_{H} 5,25 ($J = 8,1; 1,2$ Hz) e de um dubleto em δ_{H} 6,88 ($J = 8,1$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-5 e HN-6, respectivamente.

No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ observaram-se três sinais correspondentes a átomos de carbono carbonílicos C-2 (δ_{C} 157,3), C-4 (δ_{C} 173,4) e C-7 (δ_{C} 156,6), e um sinal de carbono metínico em δ_{C} 62,3 atribuído ao CH-5.

A alantoína, também chamada de aloxantina e hidantoína (BECKER et al., 2010), é um composto heterocíclico derivado da purina, sendo sintetizada em larga escala e amplamente empregada na terapêutica e cosmética (géis e cremes 0,1 – 2%), visto que aplicações dérmicas são hidratantes, calmantes, anti-irritantes, levemente queratolíticas e auxiliares do processo de cicatrização (PUBCHEM, 2020b; AKEMA, 2019). Como discutido no item 3.4.1, as metilxantinas são consideradas alcaloides por muitos autores, sendo denominadas alcaloides purínicos (RATES, 2017).

5.4.4 Amostra AEC140 – Alantoína

A amostra AEC140 (sólido cristalino branco), isolada a partir de cromatografia em coluna da fração acetato de etila das cascas do extrato bruto etanólico, foi analisada por difração em raios X, como descrito no item 5.4.2. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura, utilizando a base de dados do CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), sendo novamente identificado o alcaloide purínico alantoína (TABELA 11).

TABELA 11 – PARÂMETROS OBTIDOS EM DIFRAÇÃO DA AMOSTRA AEC140

PARÂMETROS	RESULTADOS
Sistema cristalino	Monoclínico P
a	8,02 Å
b	5,15 Å
c	14,79 Å
alfa = gama	90°
beta	93,05°
Volume	611 Å ³

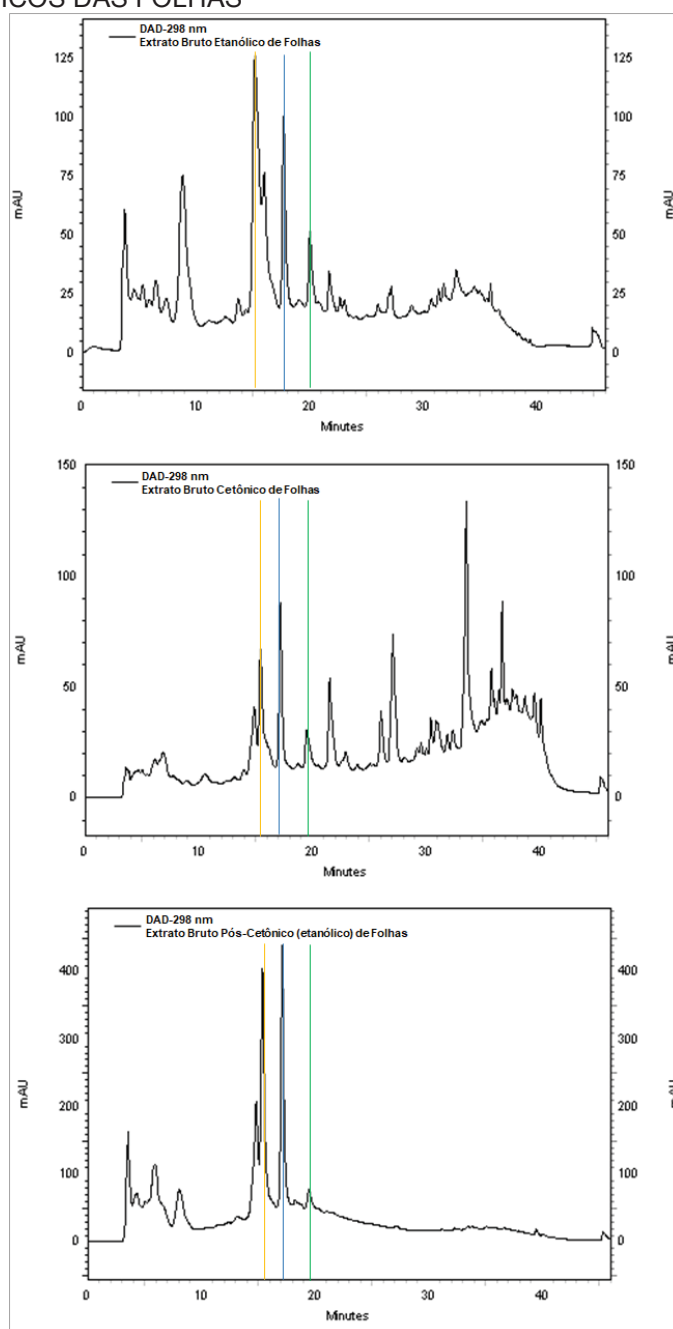
FONTE: A autora (2020).

NOTA: Temperatura de análise - 300 K; Fonte utilizada na análise - Molibdênio K α

5.4.5 Screening fitoquímico dos extratos de folhas e cascas

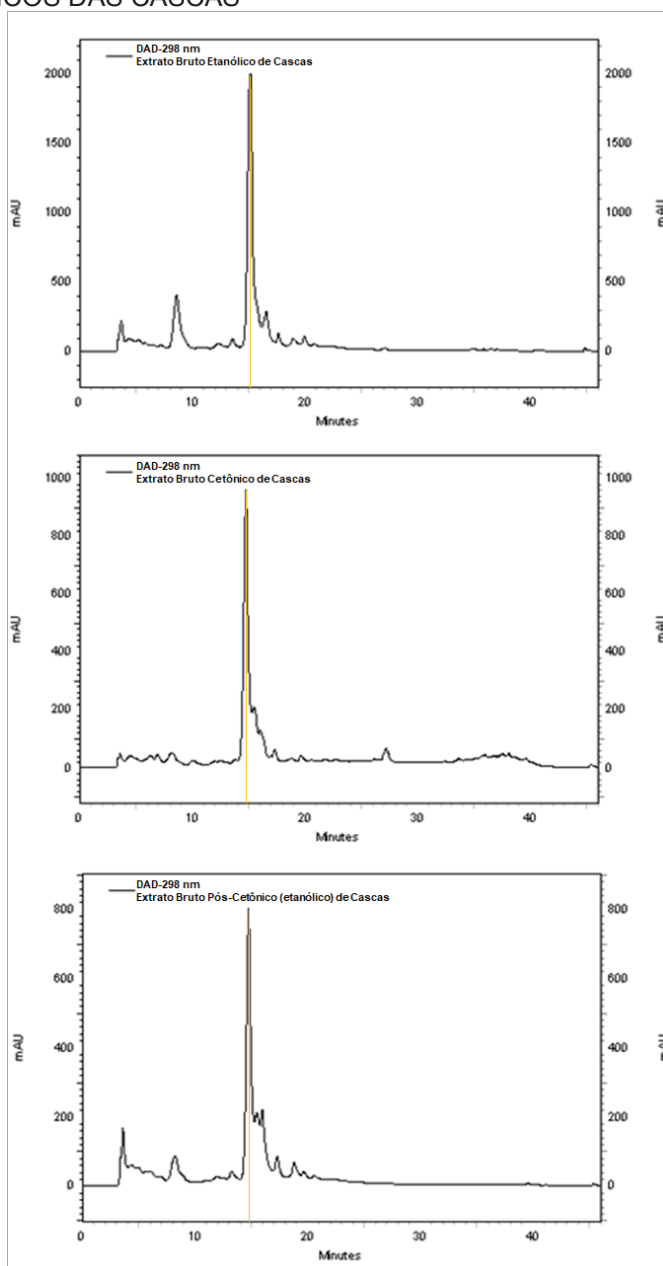
O *screening* fitoquímico dos extratos brutos etanólicos, extratos cetônicos e pós-cetônicos das folhas (FIGURA 33) e cascas (FIGURA 34) de *Cestrum intermedium* foi realizado por CLAE/DAD, revelando similaridade entre os perfis cromatográficos avaliados, principalmente entre os três extratos das cascas (FIGURA 34).

FIGURA 33 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS, CETÔNICOS E PÓS-CETÔNICOS DAS FOLHAS



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 34 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS, CETÔNICOS E PÓS-CETÔNICOS DAS CASCAS



FONTE: A autora (2020).

Observando os perfis cromatográficos dos extratos das folhas (FIGURA 33), pode-se verificar que os extratos brutos etanólico e cetônico indicam a presença de diversas substâncias com características químicas distintas. O extrato bruto etanólico pós-cetônico apresenta perfil cromatográfico aparentemente mais purificado (com diferença notável na região acima de 20 a 40 minutos), indicando que a estratégia de pré-particionamento com extração cetônica prévia, objetivando retirar do extrato substâncias de carácter mais apolar foi eficiente para essa finalidade. Ainda, pode-se

observar a presença de alguns picos com tempo de retenção semelhantes nos três extratos (destacados em cores).

Os perfis cromatográficos dos extratos das cascas (FIGURA 34) nitidamente apresentam menor variedade de componentes, principalmente de substâncias de carácter mais apolar, quando comparados aos das folhas, nas condições avaliadas. Evidencia-se ainda a presença de um pico, comum a todos os extratos das cascas, com tempo de retenção aproximado de 15 minutos (destacado em amarelo), mais intenso em relação aos demais picos cromatográficos.

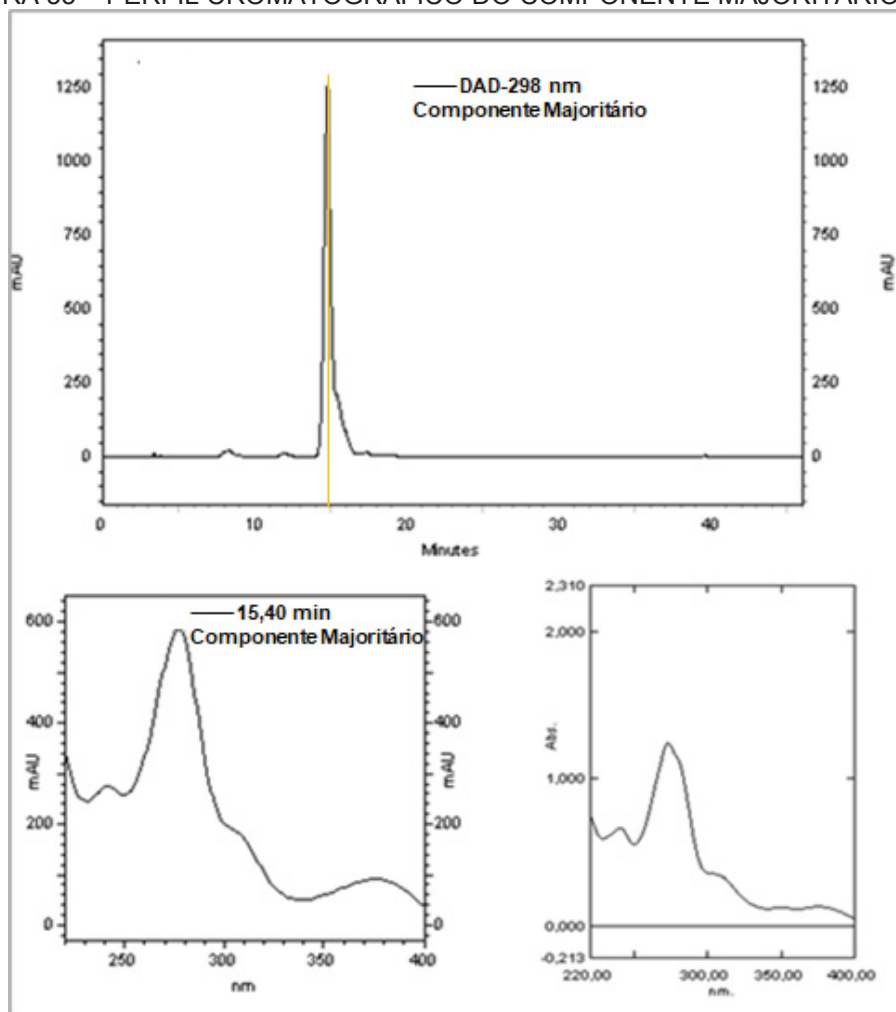
Apesar de menos evidente nos extratos das folhas (FIGURA 33), o pico destacado nos cromatogramas dos extratos das cascas (FIGURA 34) também é observado nesses extratos. Portanto, pode ser considerado um componente comum às folhas e cascas de *Cestrum intermedium*, sendo o componente majoritário dos extratos das cascas, e possivelmente um dos componentes majoritários dos extratos de folhas, com base na intensidade de seu pico em relação aos demais.

5.4.6 Perfil cromatográfico do Componente Majoritário (MAJ)

Como previamente descrito no item 4.3, um sólido amarelo foi obtido diretamente da fração acetato de etila do extrato pós-cetônico das cascas durante evaporação em banho-maria. Este material foi avaliado por CLAE/DAD e seu cromatograma (FIGURA 35) evidencia presença de pico cromatográfico com tempo de retenção 15,40 minutos (destacado em amarelo), o qual também foi observado nos cromatogramas dos extratos avaliados (FIGURAS 33 e 34).

Tendo em vista os achados para esta amostra, especialmente sua presença em todos os extratos avaliados e intensidade em relação aos demais picos cromatográficos, foi denominada de componente majoritário dos extratos de *Cestrum intermedium* (MAJ). Além disso, devido a quantidade isolada dessa substância (1,6 g) e características cromatográficas da mesma, foi considerado avaliar sua atividade em ensaios biológicos.

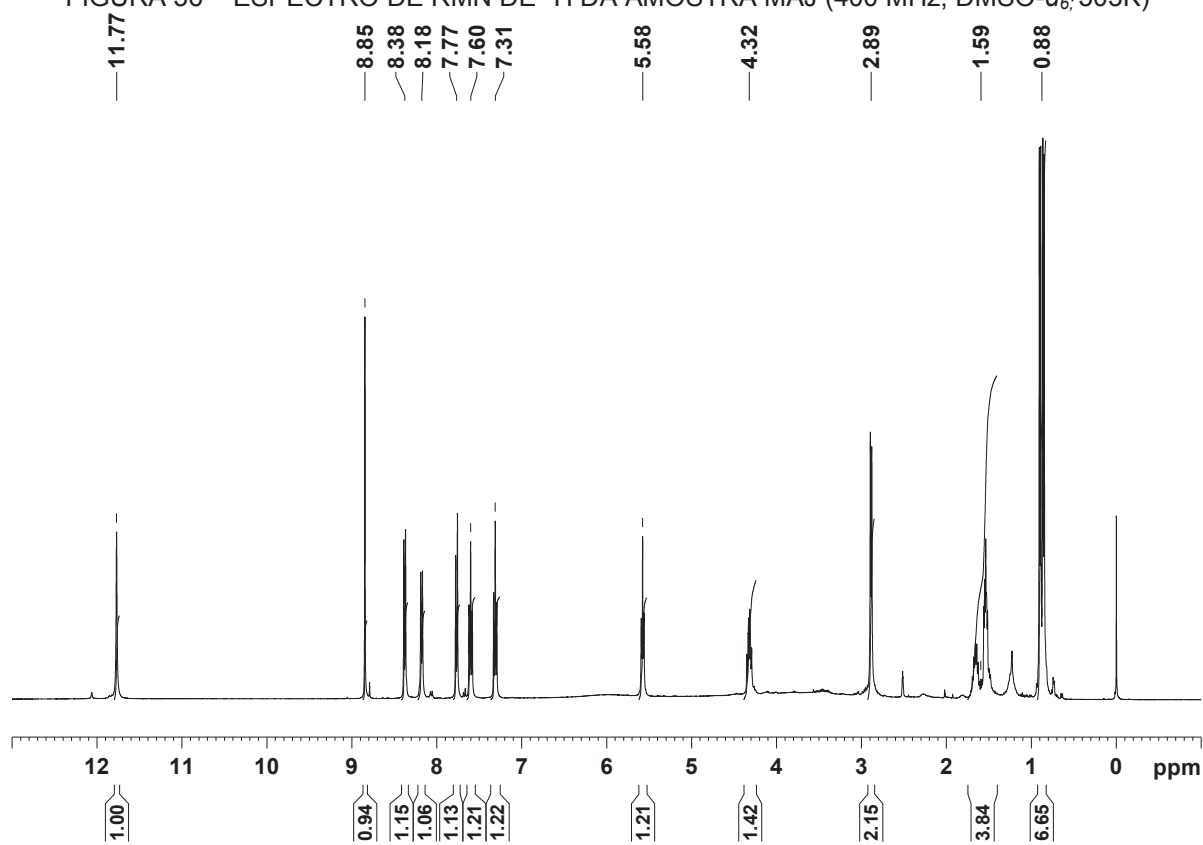
FIGURA 35 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO COMPONENTE MAJORITÁRIO (MAJ)



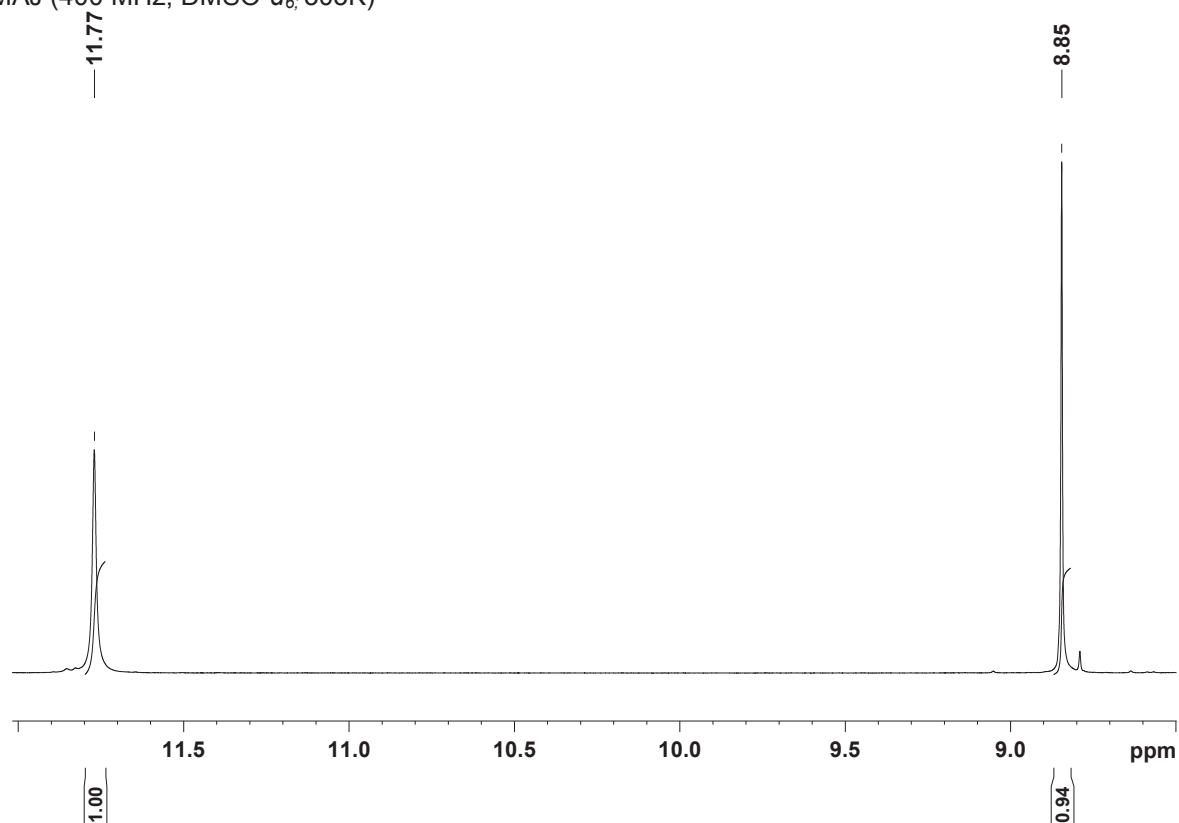
FONTE: A autora (2020).

5.4.6.1 Identificação do Componente Majoritário (MAJ)

Foram realizadas análises em RMN de ^1H (FIGURAS 36, 37, 38, 39 e 40) e ^{13}C (FIGURAS 41, 42, 43, 44, 45 e 46) para identificação da molécula do componente majoritário (MAJ). Os deslocamentos químicos observados demonstram a presença de esqueleto β -carbólico, uma classe de alcaloide indólico, em concordância com os dados reportados em literatura (TABELA 12).

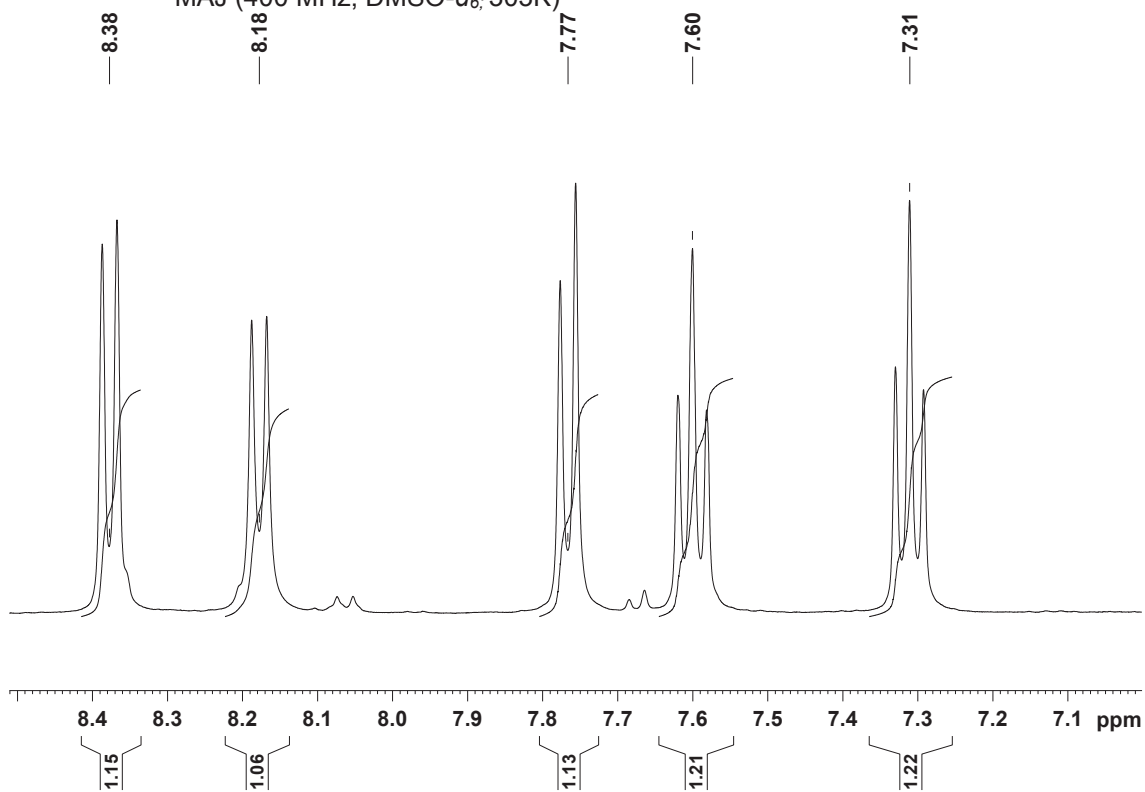
FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$; 303K)

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 37 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 12,0-8,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$; 303K)

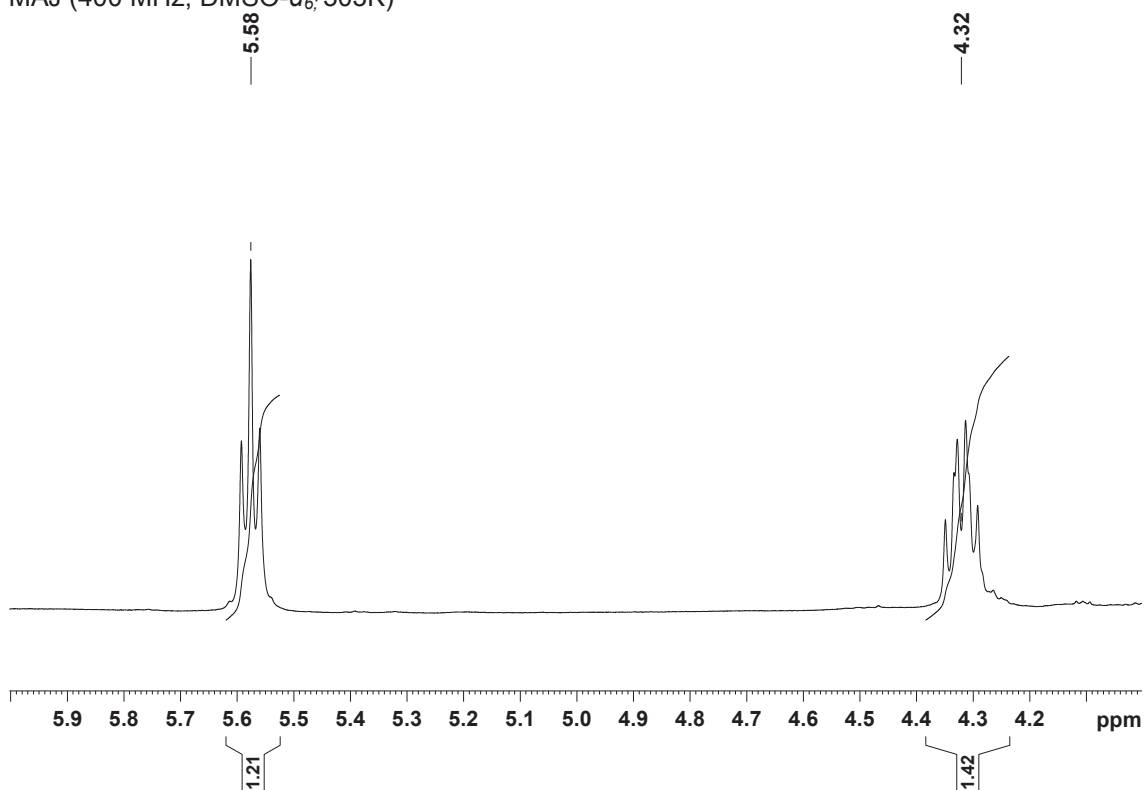
FONTE: A autora (2020).

FIGURA 38 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 8,5-7,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)



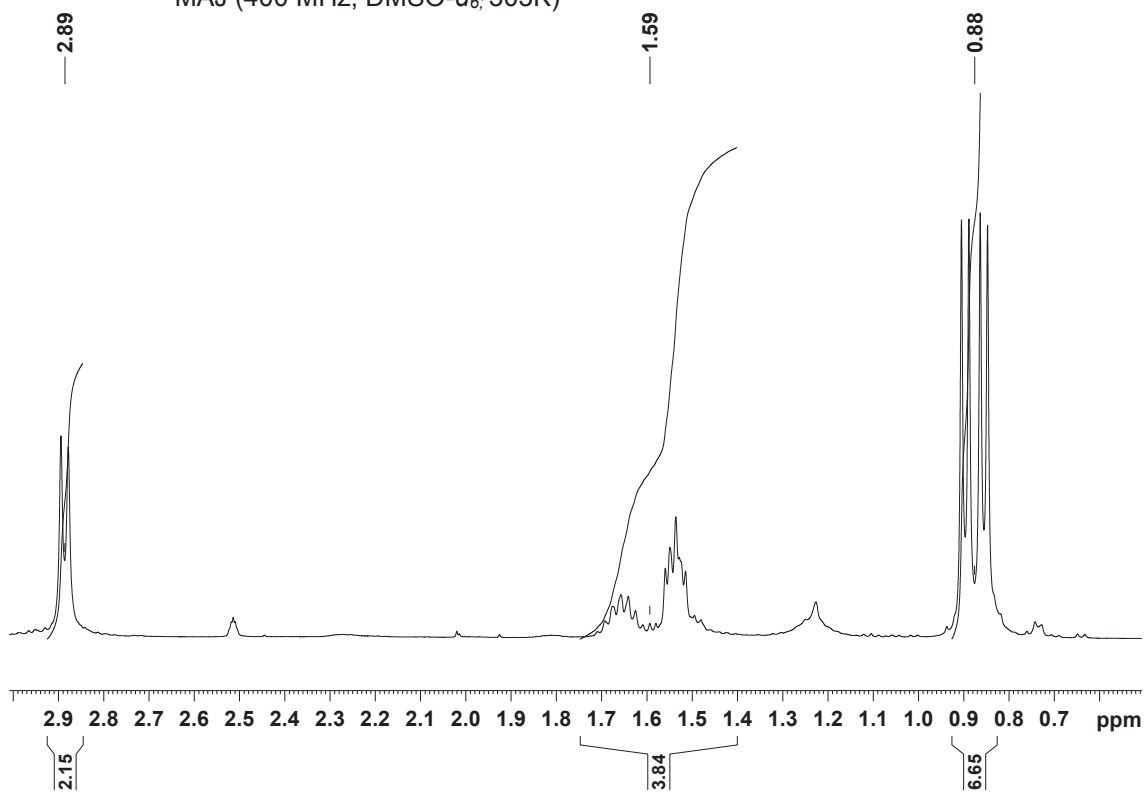
FONTE: A autora (2020).

FIGURA 39 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 6,0-4,0 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)



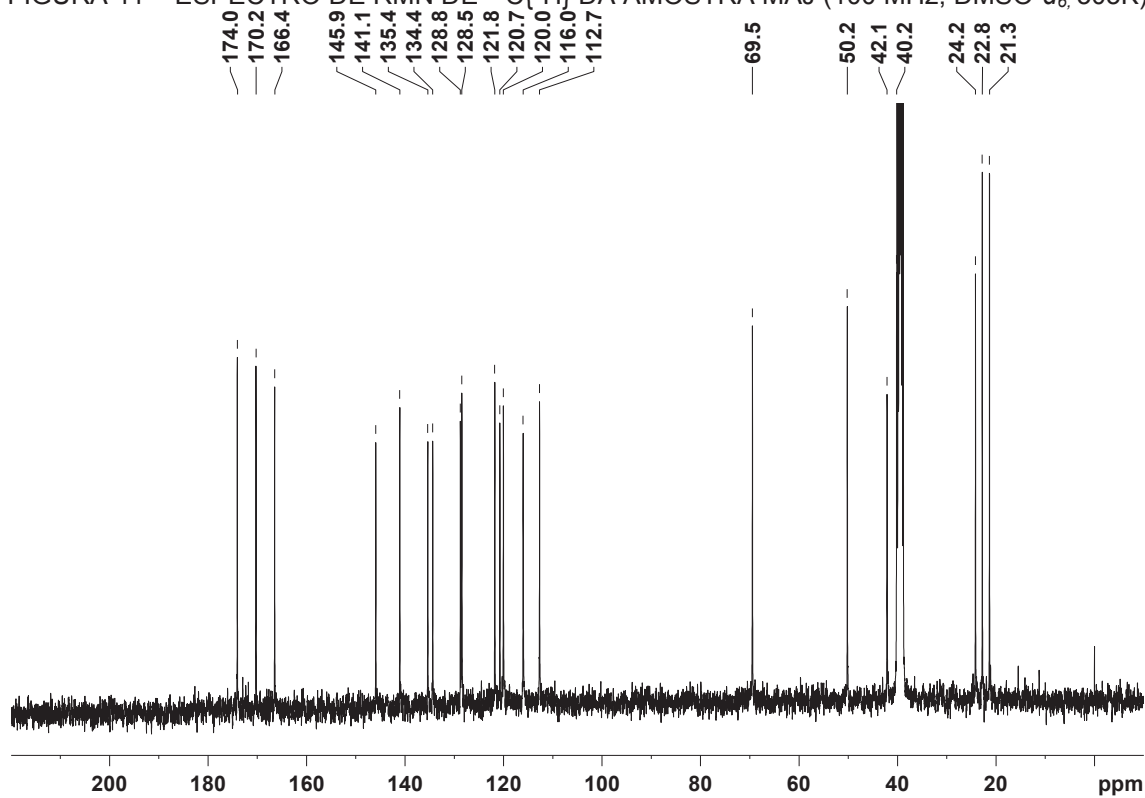
FONTE: A autora (2020).

FIGURA 40 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 3,0-0,5 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA MAJ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 41 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 42 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 175,0-165,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)

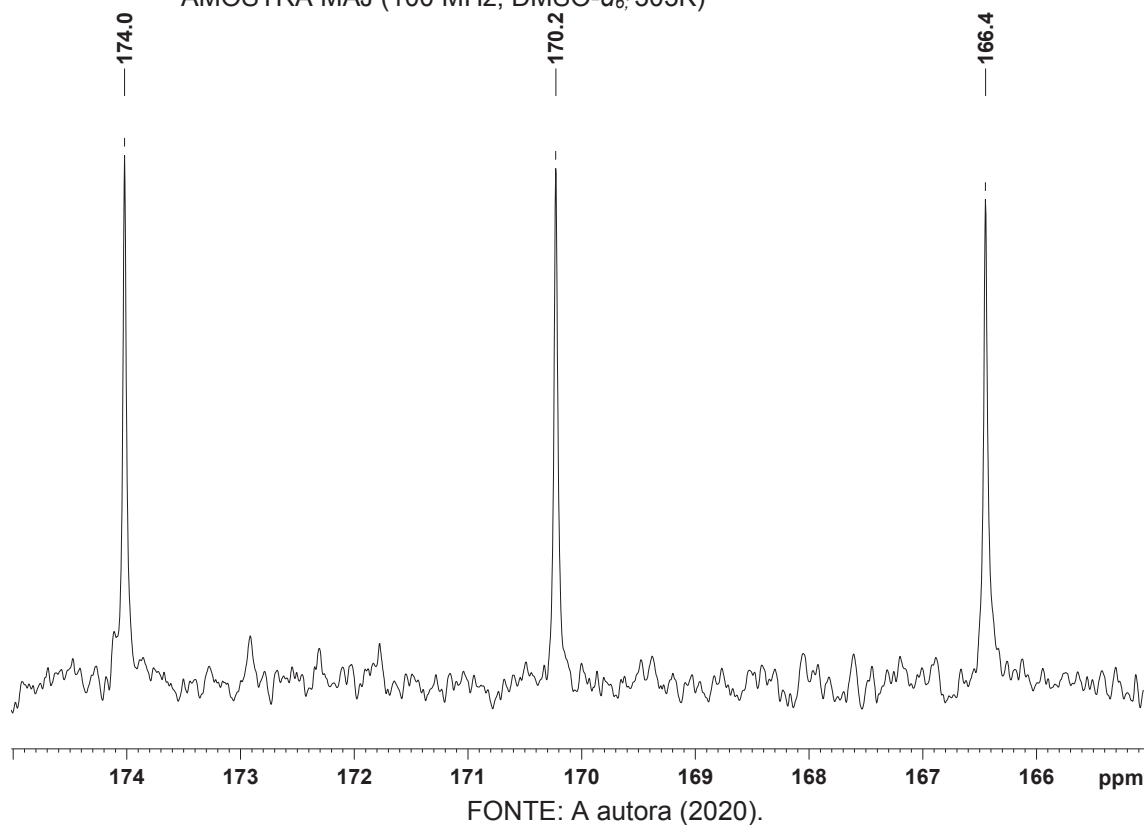


FIGURA 43 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 150,0-110,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)

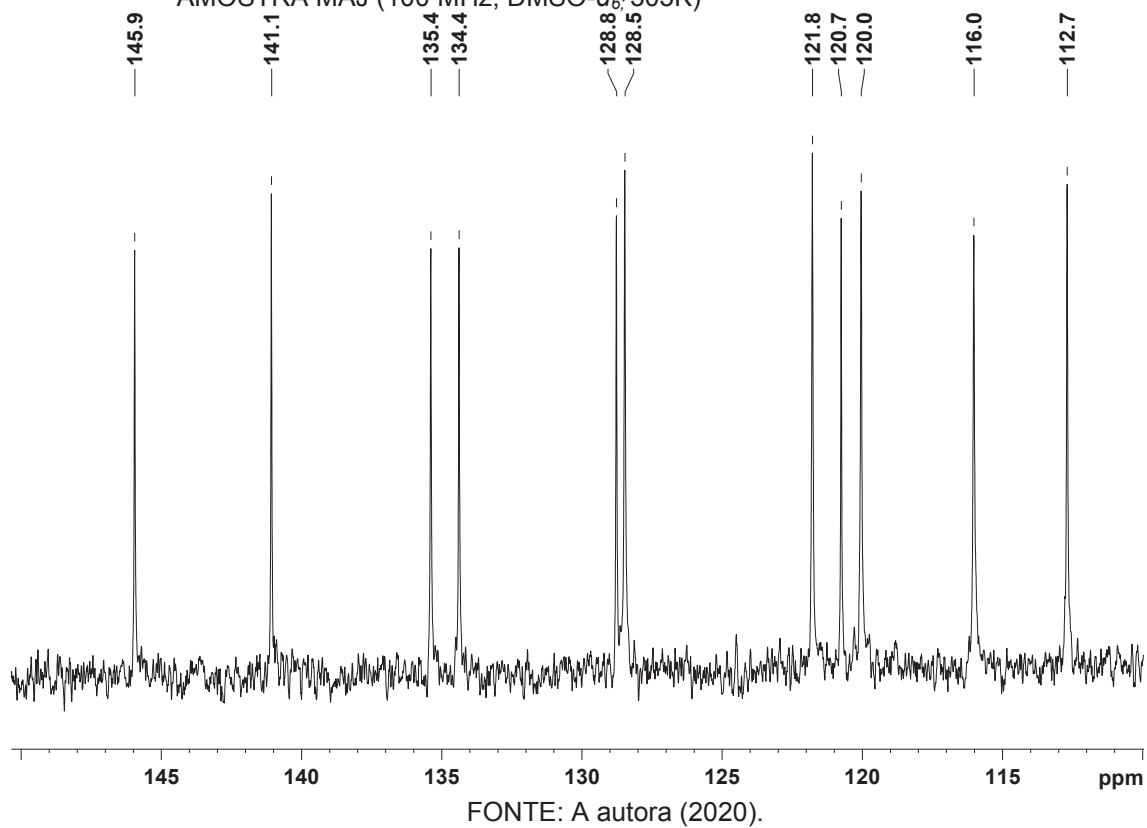


FIGURA 44 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 75,0-45,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; DMSO- d_6 ; 303K)

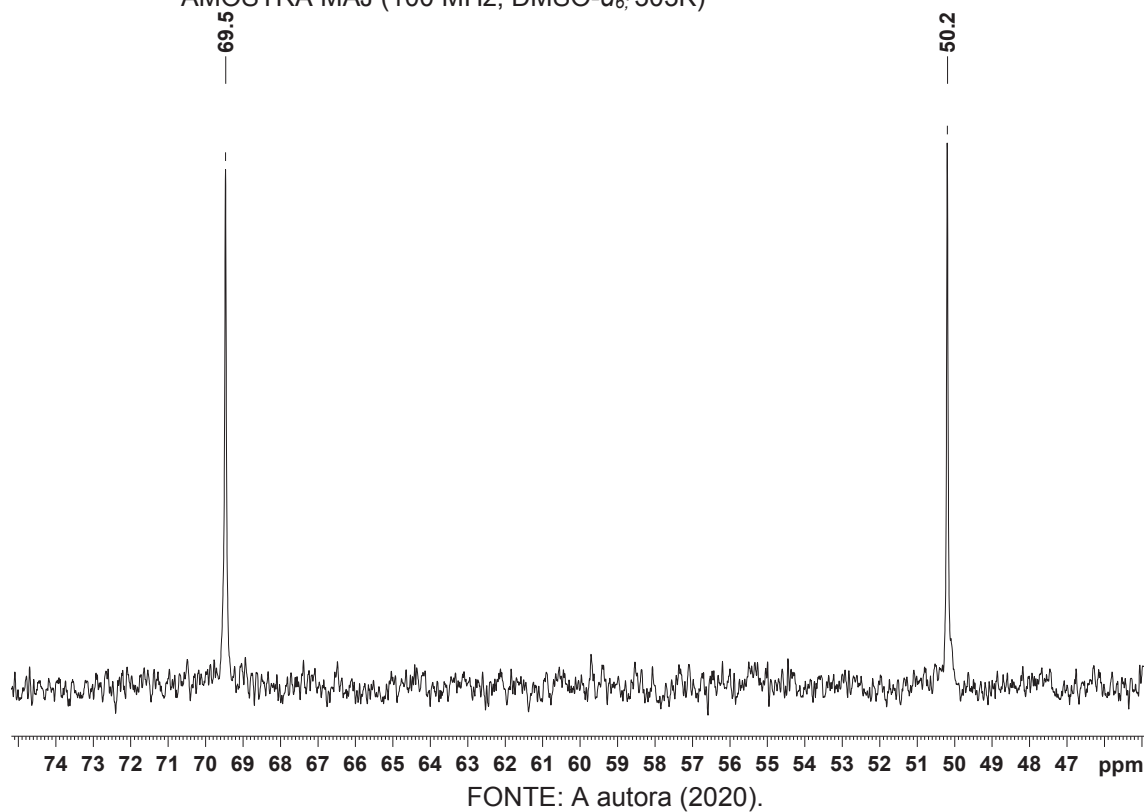


FIGURA 45 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 45,0-35,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; DMSO- d_6 ; 303K)

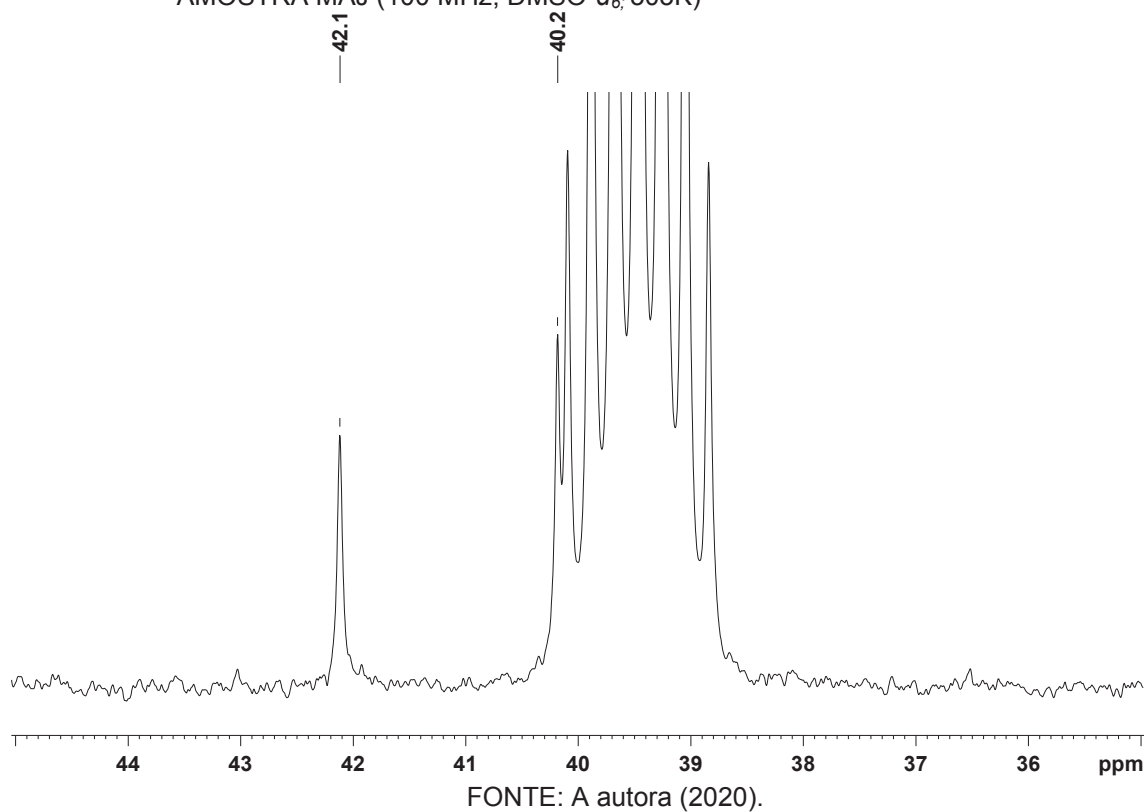
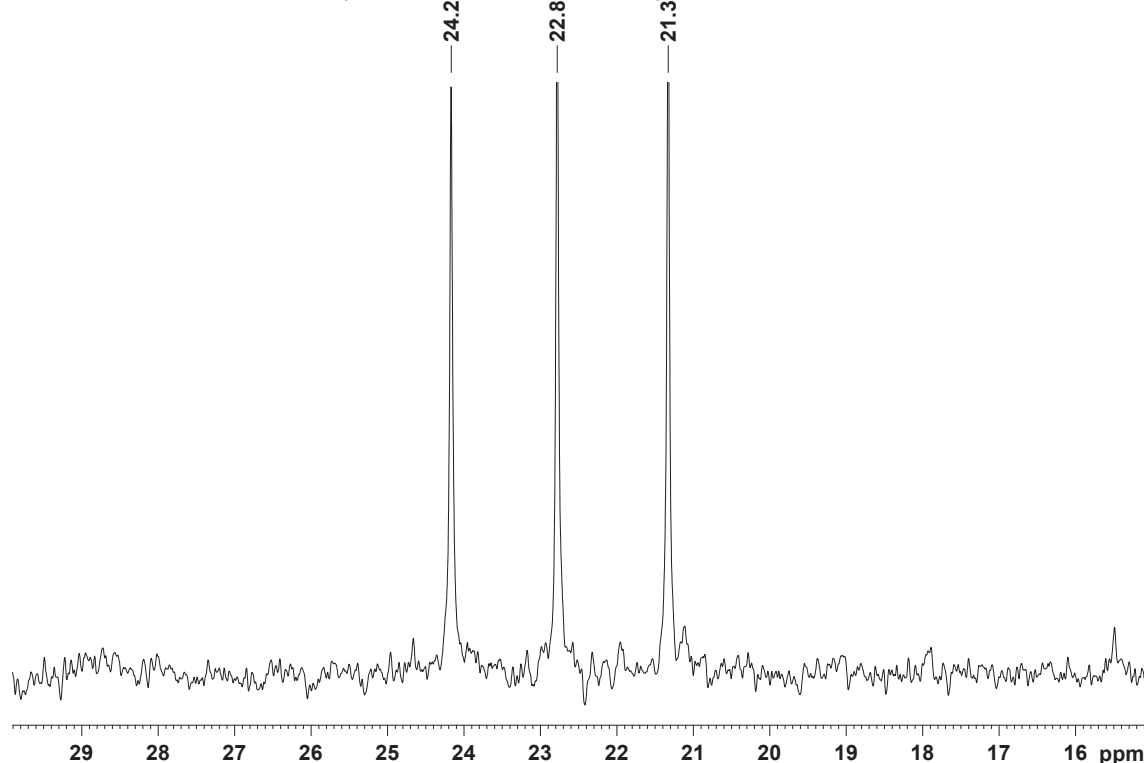


FIGURA 46 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 30,0-15,0 DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 303K)



FONTE: A autora (2020).

TABELA 12 - DADOS DE RMN ^1H (400 MHz) EM $\text{DMSO}-d_6$ A 303K DA AMOSTRA MAJ

Posição	δ_{H}	
	Experimental	Literatura ^a
1	-	-
3	-	-
4	8,85 s	8,84 s
5	8,18 d (8,0)	8,37 d (7,6)
6	7,31 t (7,6)	7,30 m
7	7,60 t (7,6)	7,59 m
8	7,77 d (8,3)	7,74 d (7,6)
9	11,77 s	11,80 s
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-

FONTE: A autora (2020).

NOTA: ^a Dados experimentais retirados dos experimentos de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e bidimensionais de HSQC e HMBC;

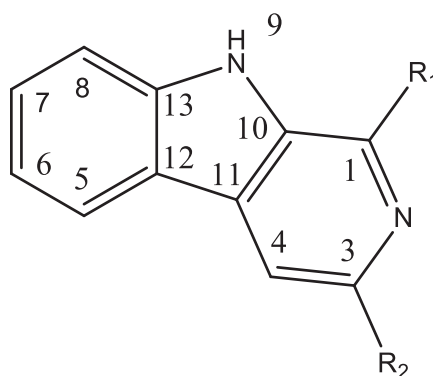
^b Dados de RMN de ^1H de acordo com Sun et al. (2004). Valores em ppm.

No espectro de ^1H (FIGURAS 36, 37, 38, 39 e 40) foi possível observar a presença de um simpleto em δ 11,77 referente a um próton amino (NH-9), de 5 hidrogênios aromáticos em δ 8,85, 8,38, 8,18, 7,77, 7,60 e 7,31, característicos de anéis do tipo β -carbolínico, além de sinais em δ 5,58 t (6,6), 4,32 m, 2,88 d (6,6), 1,59 m, 0,89 d (6,5) e 0,85 d (6,5).

No espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURAS 41, 42, 43, 44, 45 e 46) nota-se a presença de 21 sinais distintos, incluindo 5 sinais de metinas aromáticas ($-\text{CH}$) – δ 128,0, 121,8, 120,0, 116,0 e 112,7; além de 3 carbonilas (174,0, 170,2 e 166,4).

Ao comparar os dados de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de MAJ aos dados reportados em literatura, foi possível elucidar o esqueleto básico de alcaloides β -carbolínicos (FIGURA 47), uma classe de alcaloide indólico. Porém, apenas com essas informações não foi possível concluir a elucidação da estrutura química completa do componente majoritário.

FIGURA 47 – ESQUELETO BASE DA ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPONENTE MAJORITÁRIO



FONTE: A autora (2020).

Alcaloides β -carbolínicos não foram relatados no gênero *Cestrum*, porém já foram reportados em *Vestia foetida* (Solanaceae). Esta espécie está relacionada à intoxicação de cabras, desenvolvendo alterações hepáticas e neuromotoras, dentre outros sintomas, sendo observado quadro similar ocasionado por *Cestrum* sp. (McKEOUGH et al., 2005). *Vestia foetida* apresenta saponinas esteroidais, triterpenos, além de alcaloides indólicos β -carbolínicos que, apesar de não se ter conhecimento do agente causador de toxicidade desta espécie, estão relacionados aos sintomas neurológicos observados (BREVIS et al., 2005; McKEOUGH et al., 2005).

5.4.7 Amostra CF150

Em relação à amostra CF150, obtida através de coluna cromatográfica da fração clorofórmio das folhas, foi possível observar deslocamentos químicos similares aos observados nos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da amostra MAJ, indicando tratar-se da mesma substância. Os espectros de RMN de ^1H (FIGURA 48) e ^{13}C (FIGURA 49)

de CF150 sobrepostos aos de MAJ, em adição aos experimentos de DEPT (FIGURA 50) e HSQC (FIGURAS 51 a 55) de CF150, permitiram extrair mais informações acerca da provável estrutura química deste alcaloide β -carbolínico, conforme TABELA 13.

FIGURA 48 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA MAJ E DA AMOSTRA CF150 (400 E 600 MHZ, RESPECTIVAMENTE; $\text{DMSO-}d_6$).

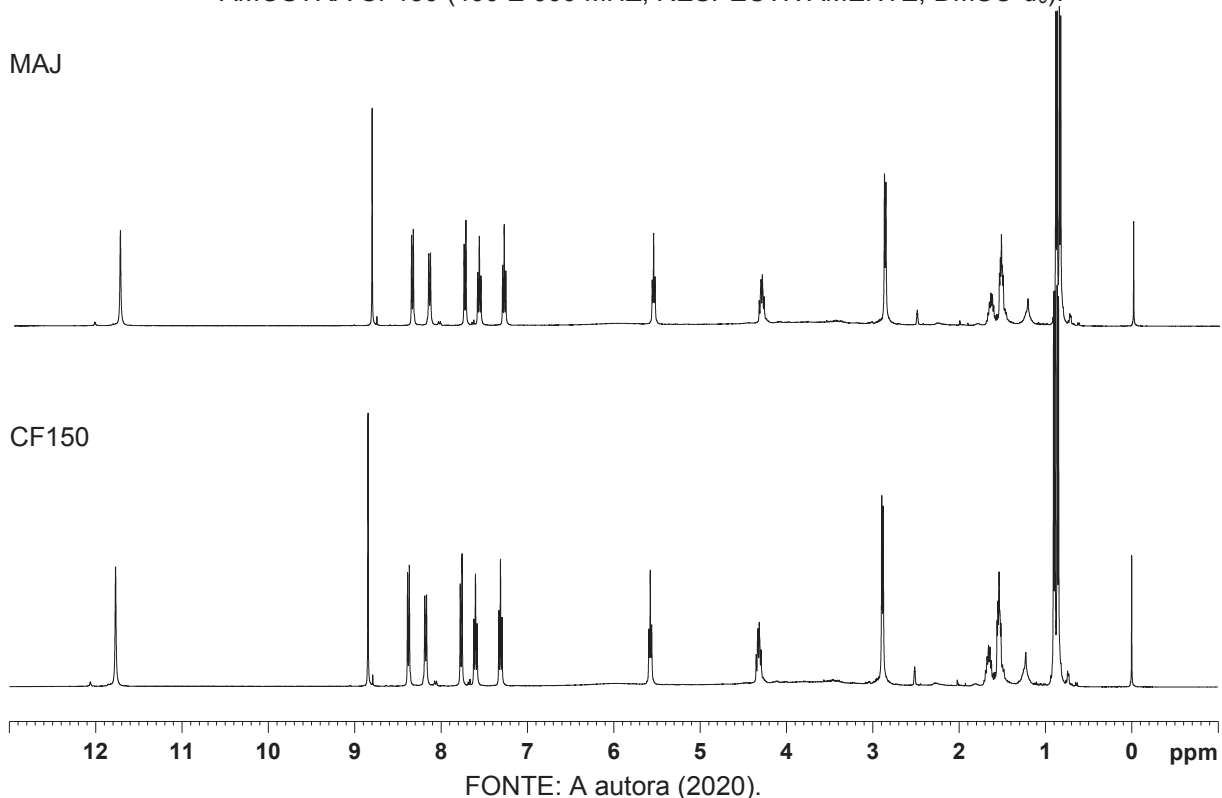


FIGURA 49 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA MAJ E DA AMOSTRA CF150 (100 E 150 MHz, RESPECTIVAMENTE; $\text{DMSO}-d_6$)

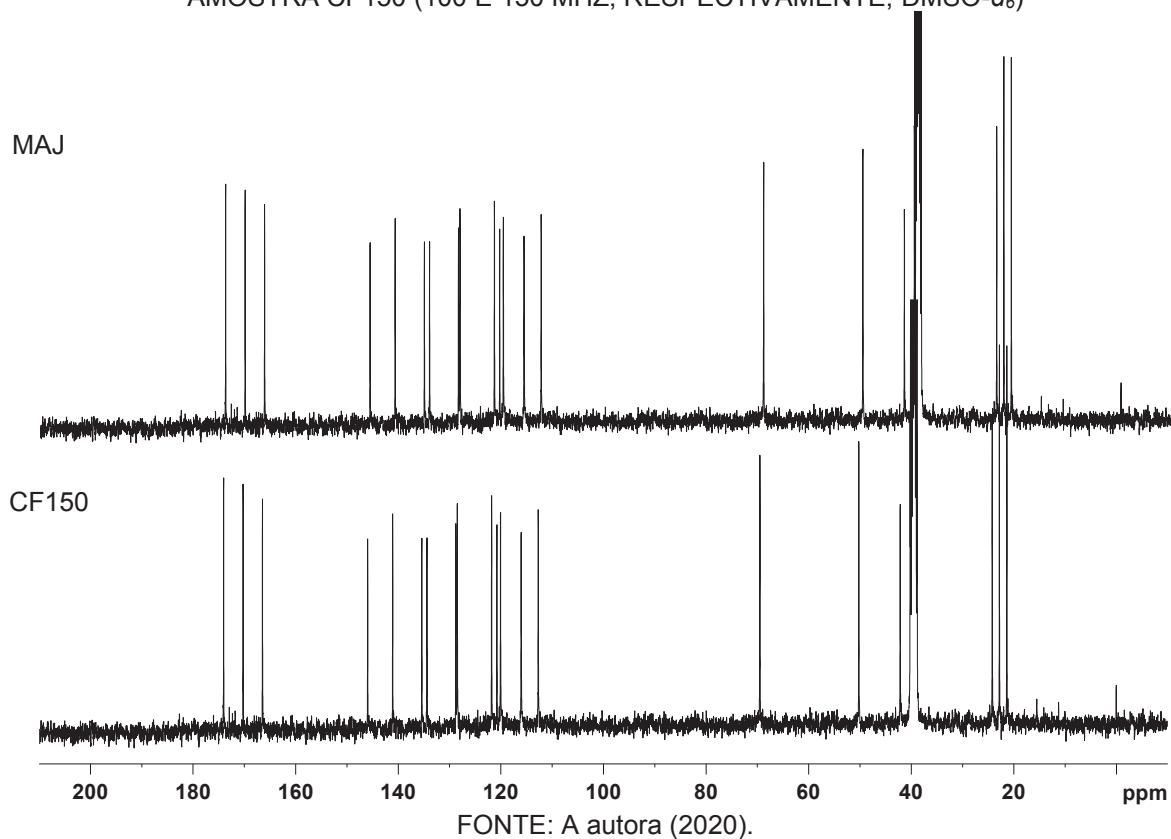
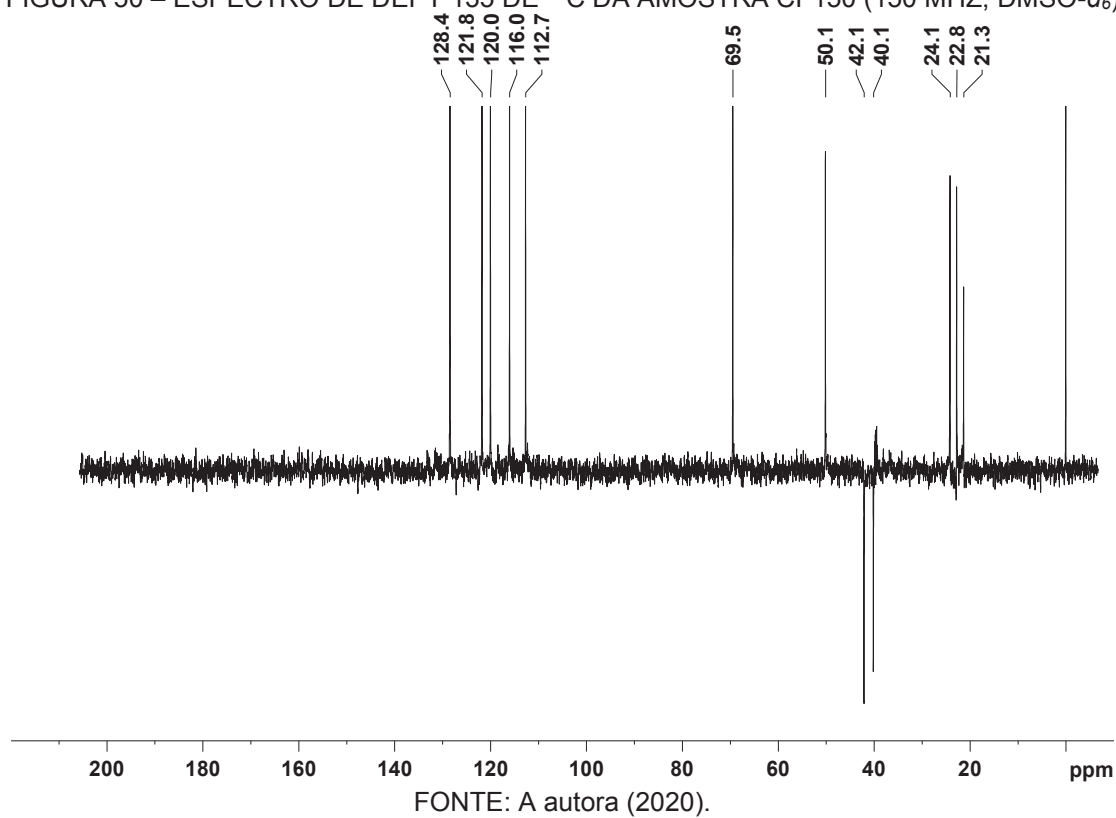


FIGURA 50 – ESPECTRO DE DEPT 135 DE ^{13}C DA AMOSTRA CF150 (150 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)



Conforme dados do experimento de DEPT (FIGURA 50) nota-se a presença de 5 carbonos aromáticos do tipo metina (δ 128,4; 121,8; 120,0; 116,0; 112,7); 9 carbonos quaternários (δ 174,0; 170,2; 166,4; 145,9; 141,1; 135,4; 134,4; 128,8 e 120,7); 2 carbonos metilenos (CH_2) em δ 42,1 e 40,1; 3 carbonos metila em δ 24,1; 22,8 e 21,3.

FIGURA 51 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) PARA A AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)

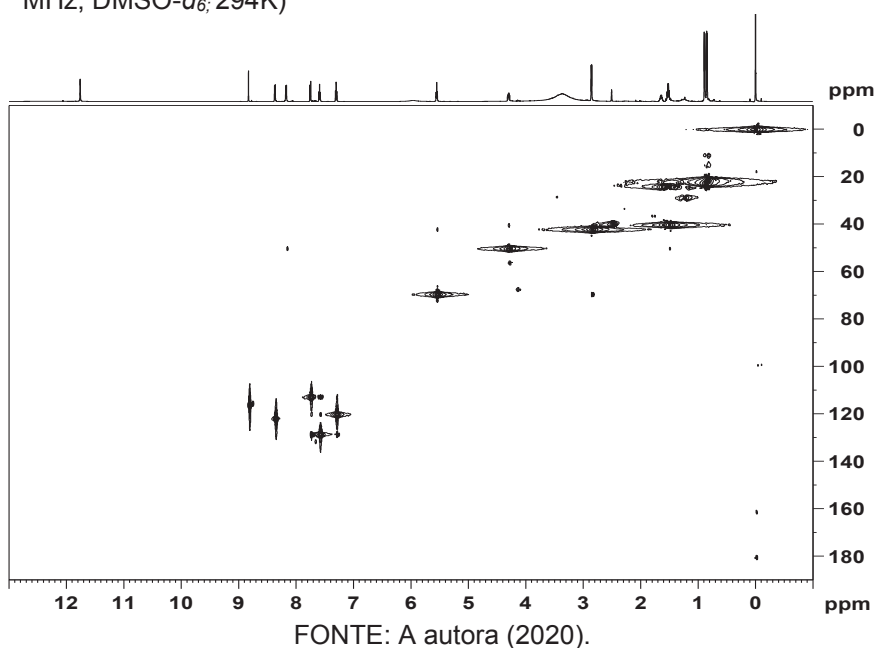


FIGURA 52 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 8,85, 8,38 E 8,18 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)

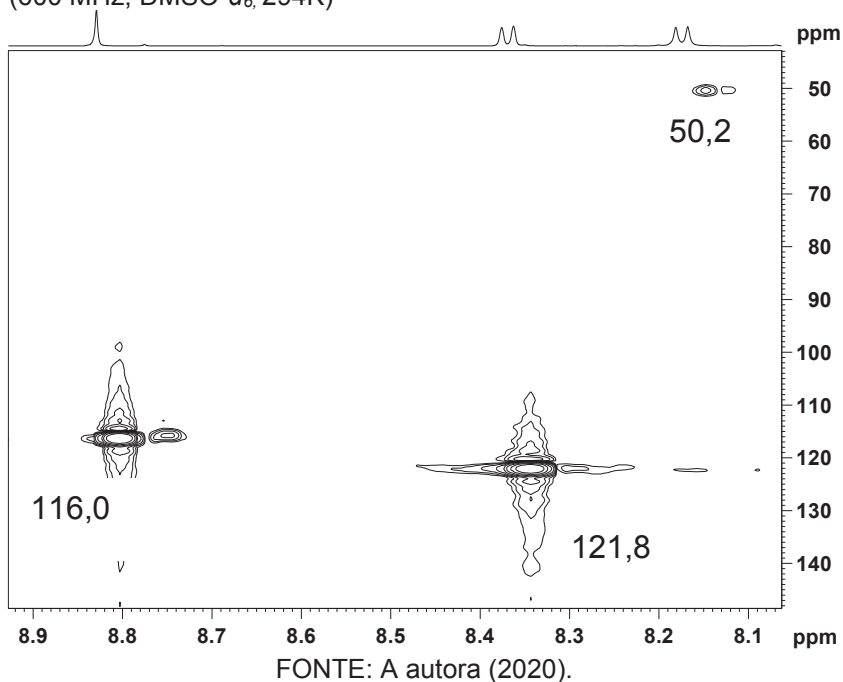


FIGURA 53 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 7,77, 7,60 E 7,31 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)

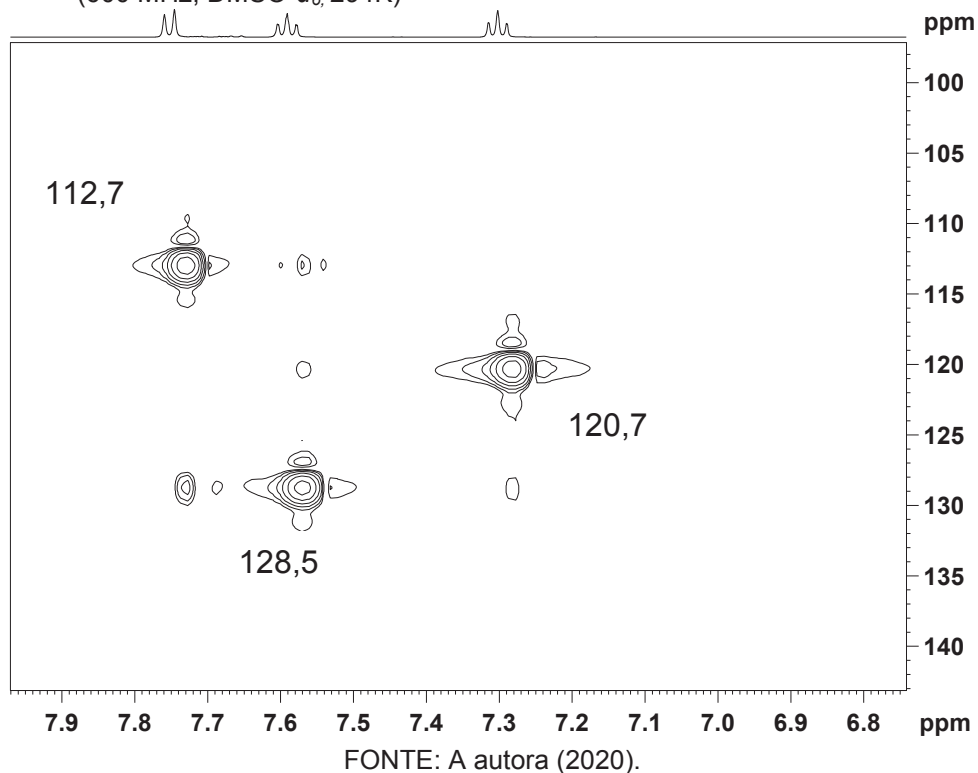


FIGURA 54 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 5,58, 4,32, 2,88, 1,54 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)

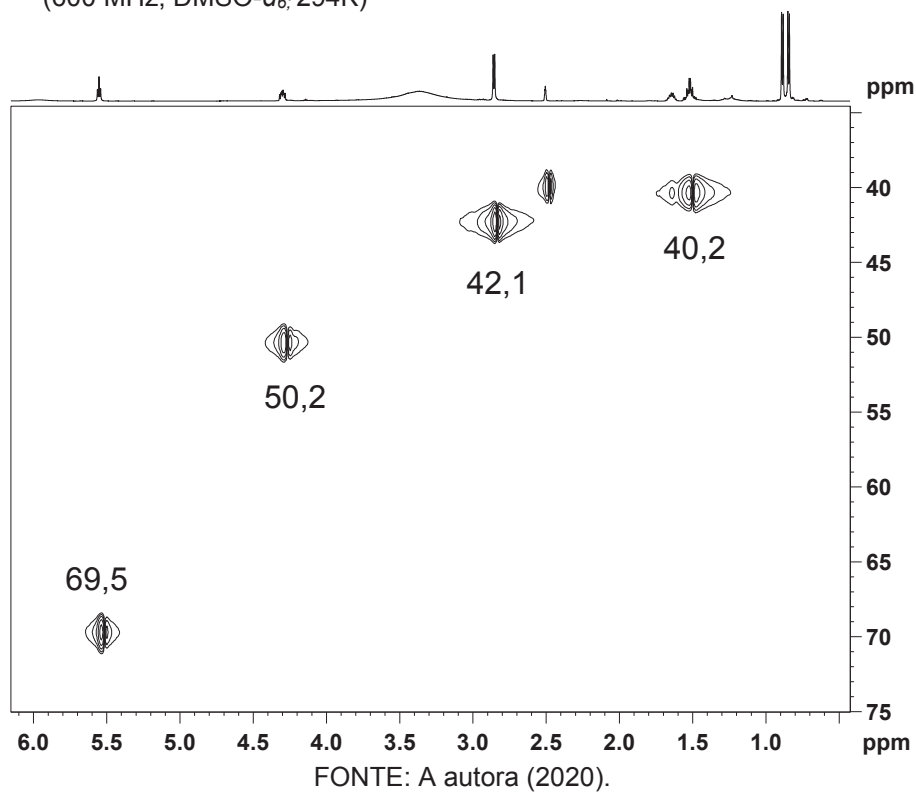
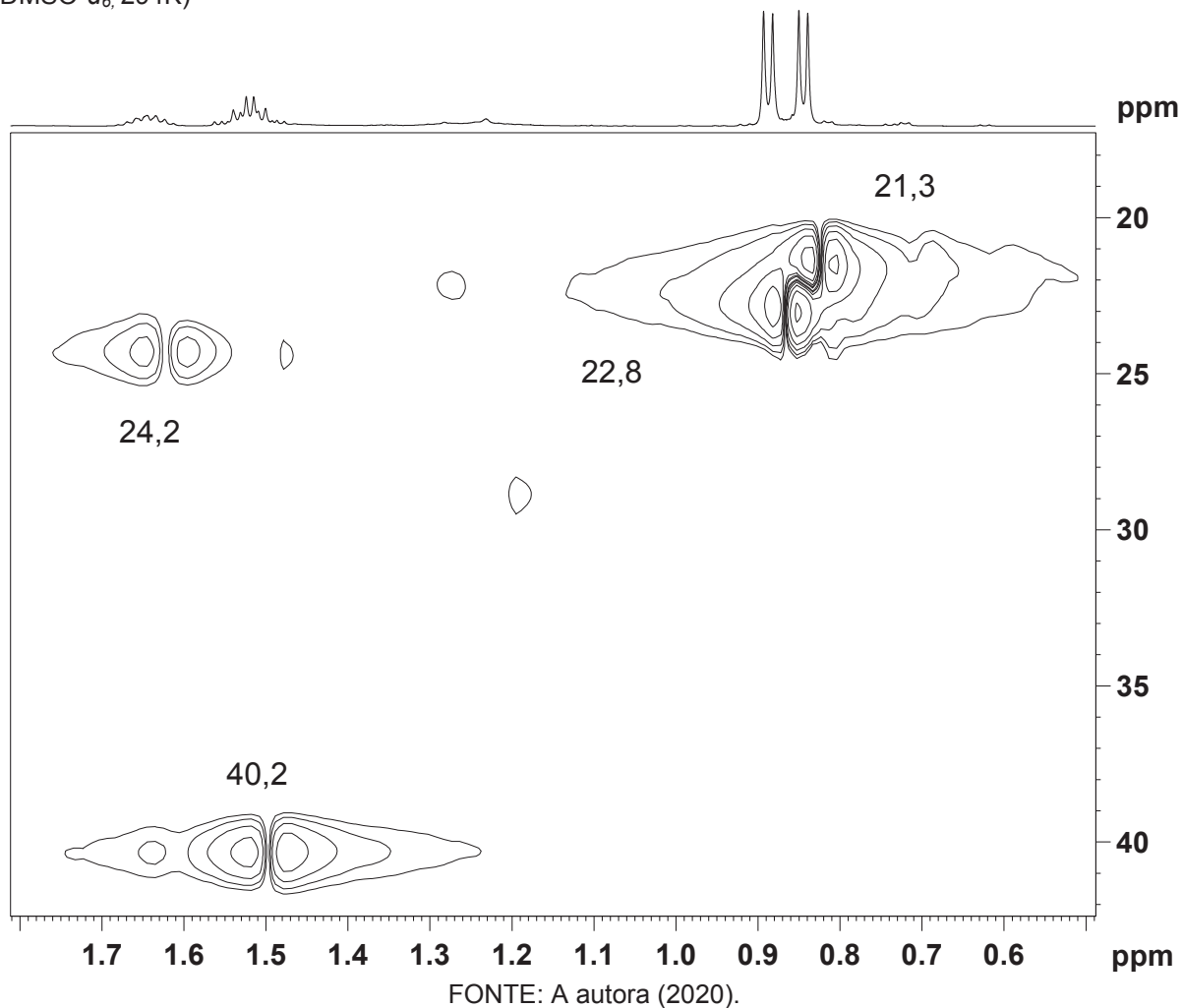


FIGURA 55 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 1,66, 1,54, 0,89 E 0,86 DA AMOSTRA CF 150 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$; 294K)



O experimento de DEPT, assim como o mapa de correlação de HSQC permitiu que outras informações fossem retiradas a fim de tentar elucidar a estrutura em questão, reforçando a hipótese de que possivelmente trata-se de um alcaloide do tipo β -carbolínico, entretanto mais experimentos são necessários na tentativa de fechar uma proposta e confirmar sua estrutura.

TABELA 13 - DADOS DE RMN ^1H (600 MHz) EM $\text{DMSO}-d_6$ A 303K DA AMOSTRA CF 150

Posição	δ_{H}		δ_{C}	
	Experimental	Literatura ^a	Experimental ^a	Literatura ^b
1	-	-	145,9	145,2
3	-	-	135,4	135,4
4	8,85 s	8,84 s	116,0	115,9
5	8,18 d (8,0)	8,37 d (7,6)	121,8	121,8
6	7,31 t (7,6)	7,30 m	120,0	119,9
7	7,60 t (7,6)	7,59 m	128,5	128,4
8	7,77 d (8,3)	7,74 d (7,6)	112,7	112,6
9	11,77 s	11,80 s	-	-
10	-	-	133,4	134,8
11	-	-	-	128,4
12	-	-	120,7	120,7
13	-	-	-	140,9
Outros sinais:	5,58 t (6,6) 2,88 d (6,6) 4,32 m 1,66 m 1,54 m 0,89 d (6,5) 0,85 d (6,5) -		69,5 42,1 50,2 24,2 40,2 21,3 22,8 174,0 170,2 166,4	

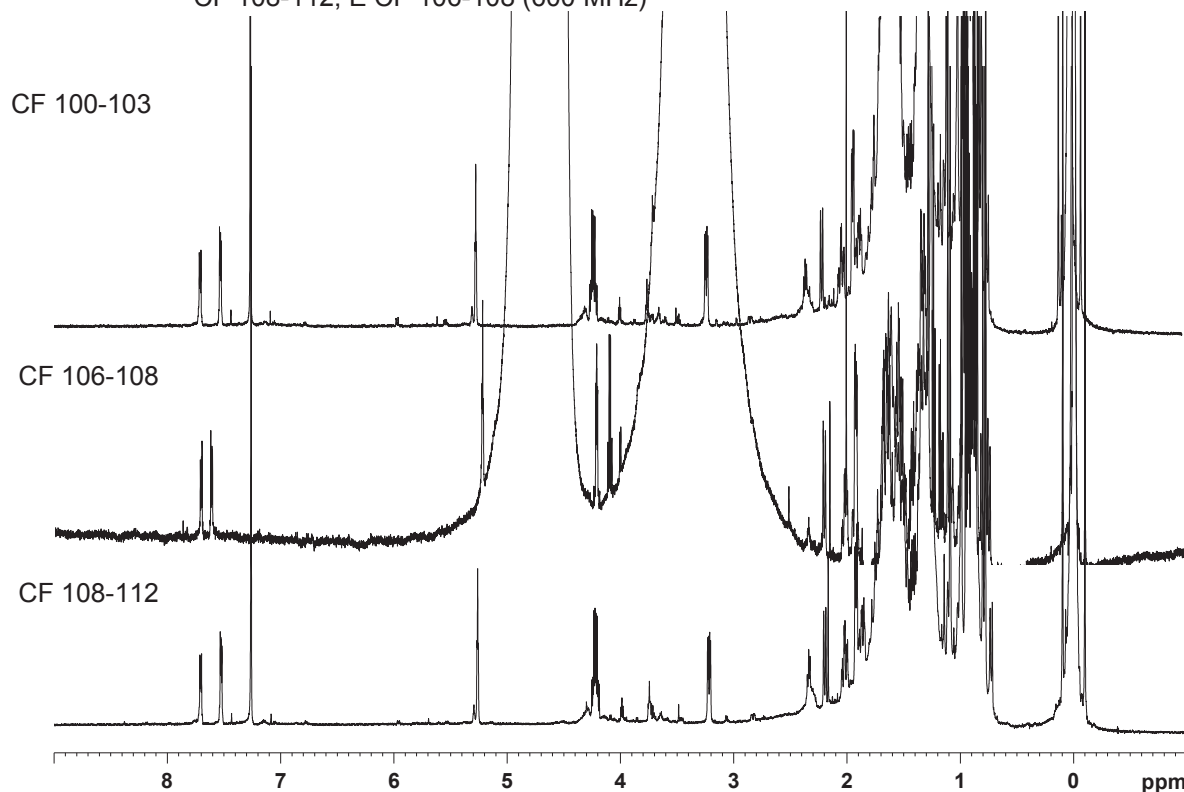
FONTE: A autora (2020).

^a Dados de RMN de ^1H de acordo com Sun et al. (2004). Valores em ppm.NOTA: ^b Dados experimentais retirados dos experimentos de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e bidimensionais de HSQC e HMBC.

5.4.8 Amostras CF100-103, CF 106-107 e CF108-112

As amostras CF100-103, CF106-107 e CF108-112, obtidas a partir de coluna cromatográfica da fração clorofórmio (assim como CF150), apresentam deslocamentos químicos de ^1H similares entre si, portanto consideradas a mesma substância, como pode-se observar na FIGURA 56.

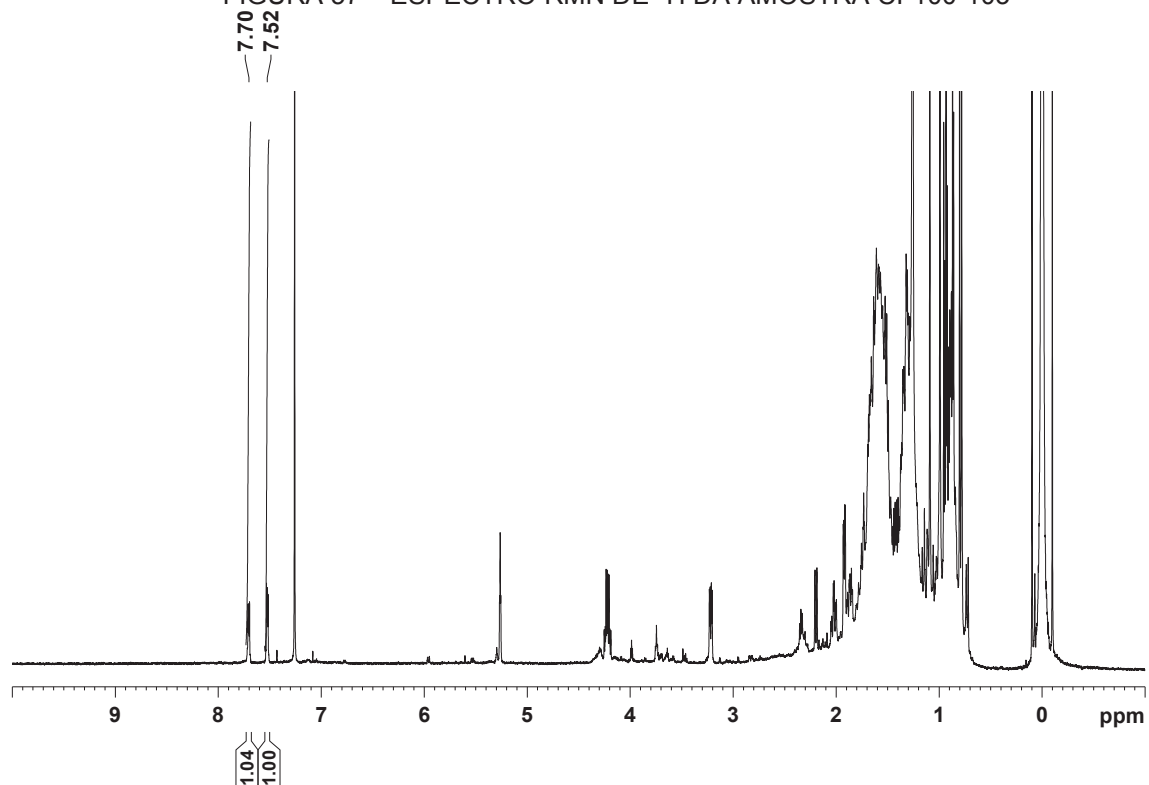
FIGURA 56 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS AMOSTRAS CF100-103, CF 108-112, E CF 106-108 (600 MHz)



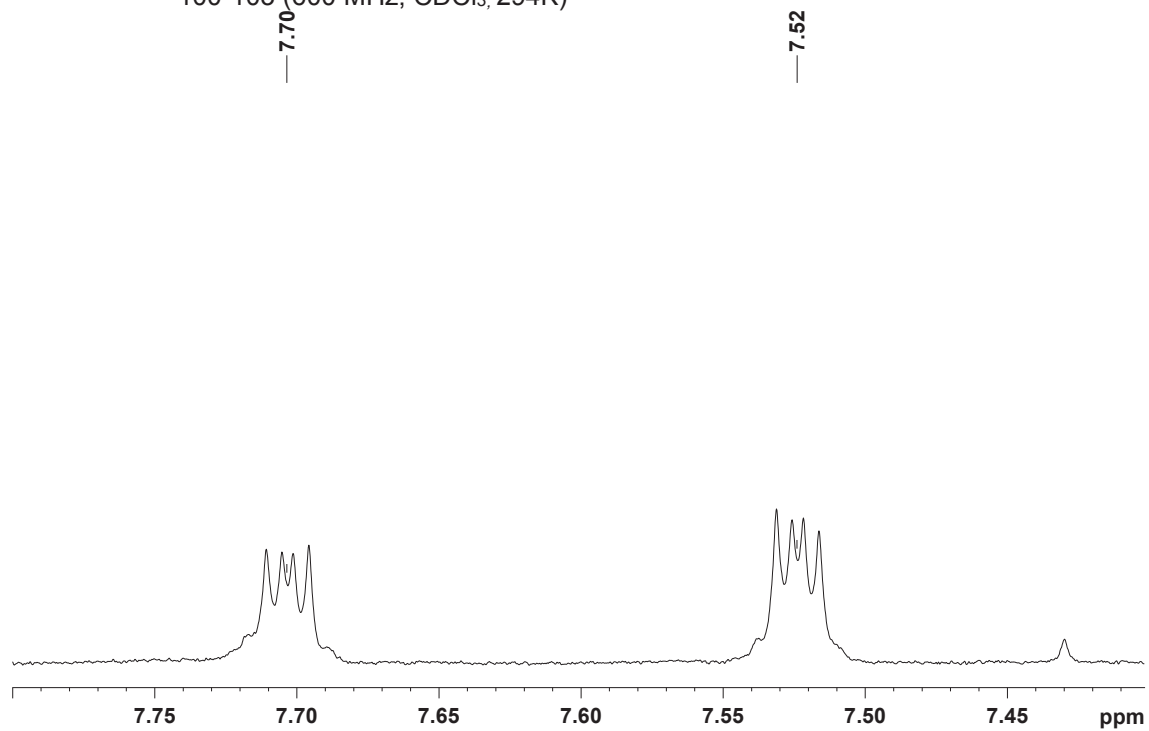
FONTE: A autora (2020).

NOTA: as amostras CF 100-103 e CF 108-112 foram preparadas em CDCl_3 , enquanto a amostra CF 106-108 foi preparada em CD_3OD .

Avaliando o espectro de ^1H da amostra CF100-103 (FIGURAS 57 e 58), além do experimento de correlação direta ^1H - ^{13}C (FIGURAS 59 e 60) foi possível verificar que a amostra apresenta deslocamentos químicos compatíveis ao esqueleto básico da molécula de Ftalato (FIGURA 61), quando comparados aos dados descritos em literatura (NAIR et al., 2012) (TABELA 14).

FIGURA 57 – ESPECTRO RMN DE ^1H DA AMOSTRA CF100-103

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 58 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,8-7,4 DO ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA CF 100-103 (600 MHz; CDCl_3 ; 294K)

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 59 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) PARA A AMOSTRA CF 100-103 (600 MHz; CDCl_3 ; 294K)

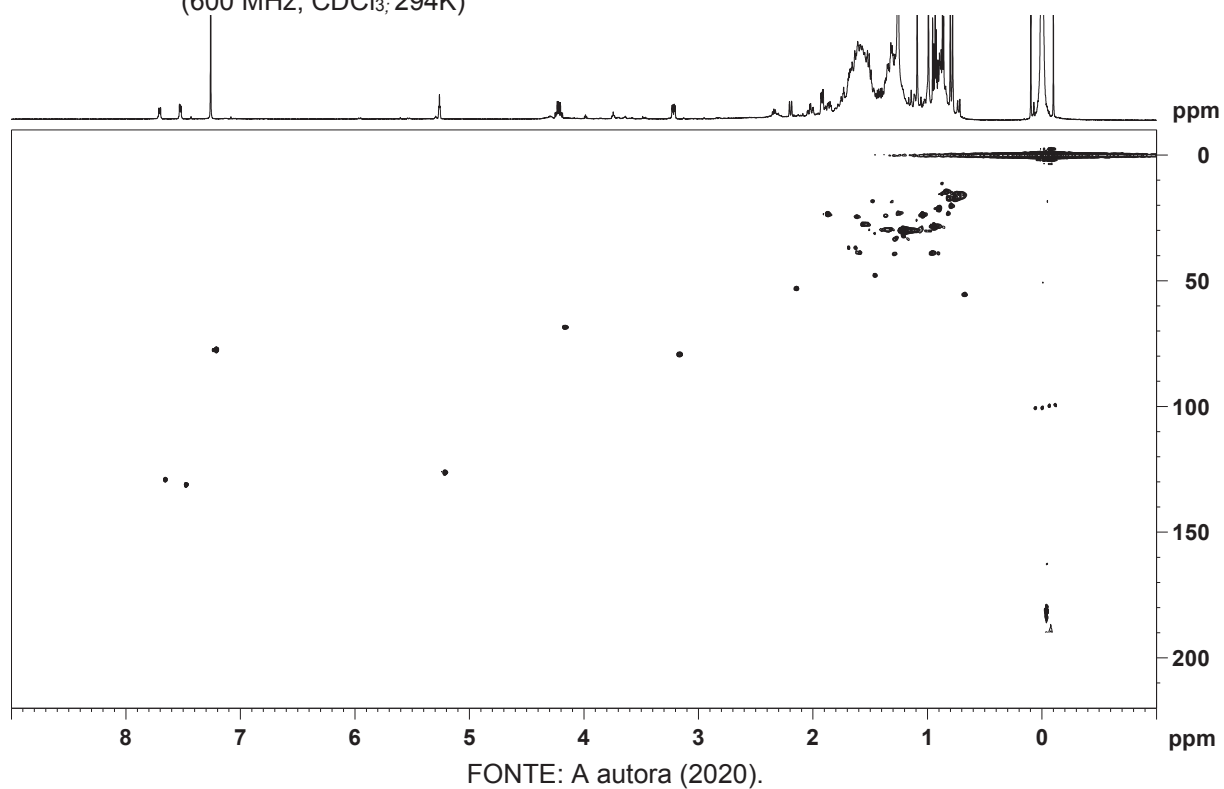
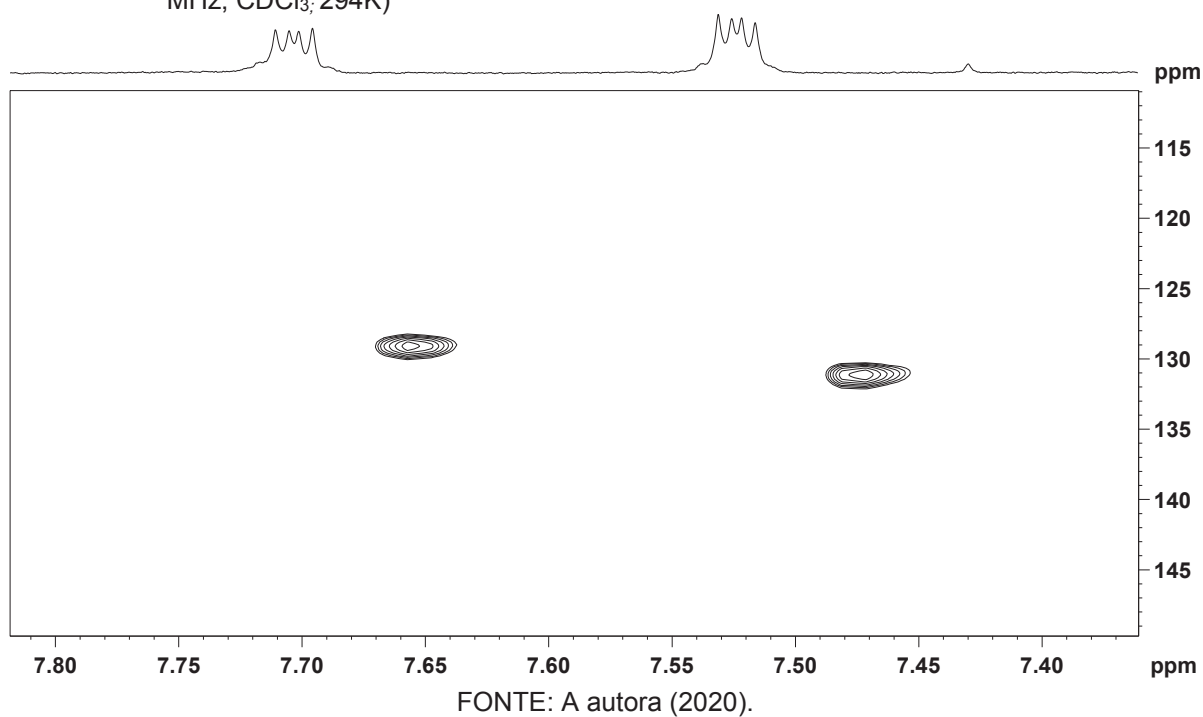
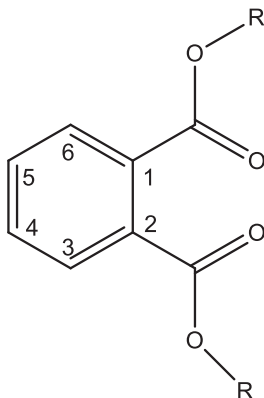


FIGURA 60 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) RELATIVAS AOS SINAIS EM δ 7,70 E 7,52 DA AMOSTRA CF 100-103 (600 MHz; CDCl_3 ; 294K)



Destaca-se a presença de dois duplos dupletos em δ 7,70 (5,7; 3,3) e 7,52 (5,7; 3,3) referentes a presença de dois hidrogênios aromáticos equivalentes (FIGURA 60).

FIGURA 61 – ESTRUTURA QUÍMICA PARCIALMENTE ELUCIDADA DE CF100-103 - FTALATO



FONTE: A autora (2020).

TABELA 14 - DADOS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DA AMOSTRA CF100-103 EM CDCl_3

Posição	δ_{H}		δ_{C}	
	Experimental	Literatura ^a	Experimental ^a	Literatura ^b
1				
2				
3	7,70 dd (5,7; 3,3)	7,70 dd (5,68; 3,32)	129,1	129,1
4	7,52 dd (5,7; 3,3)	7,52 dd (5,68; 3,32)	131,2	131,2
5	7,52 dd (5,7; 3,3)	7,52 dd (5,68; 3,32)	131,2	131,2
6	7,70 dd (5,7; 3,3)	7,70 dd (5,68; 3,32)	129,1	129,1

FONTE: A autora (2020).

NOTA: ^a Dados experimentais retirados dos experimentos bidimensionais de HSQC;

^b Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de acordo com Nair et al. (2012).

Este plastificante é amplamente utilizado na fabricação de polivinilclorido (PVC), apresentando atividade tóxica relacionada à carcinogênese, teratogenia, influência no sistema endócrino, entre outras (NAIR et al., 2012; SAEIDNIA et al., 2013). Por não ser quimicamente ligado ao plástico (NAIR et al., 2012), ftalatos são facilmente carregados ao ambiente, sendo encontrados com frequência em plantas, havendo indícios de que também são capazes de sintetizá-lo (*Phyllanthus* spp. e *Calotropis gigantea*) (SAEIDNIA et al., 2013).

5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.5.1 Avaliação da atividade alelopática

Macias et al. (2000) propõem uso de várias espécies de ambas as classes taxonômicas (monocotiledôneas e eucotiledôneas) para este bioensaio, sendo as mais comuns *Allium cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface), respectivamente. Metabólitos secundários com atividade aleloquímica podem ser tóxicos à determinada espécie enquanto inócuos a outra, devido à multiplicidade de ações aos processos fisiológicos (CÂNDIDO, 2011). Portanto, o emprego de monocotiledôneas e eucotiledôneas proporciona amplitude ao ensaio, uma vez que suas diferenças anatômicas são representativas, sendo evidenciadas em mecanismos de ação de determinados herbicidas seletivos, eficazes apenas em plantas de vasos condutores contínuos como as monocotiledôneas (OSU, 2020).

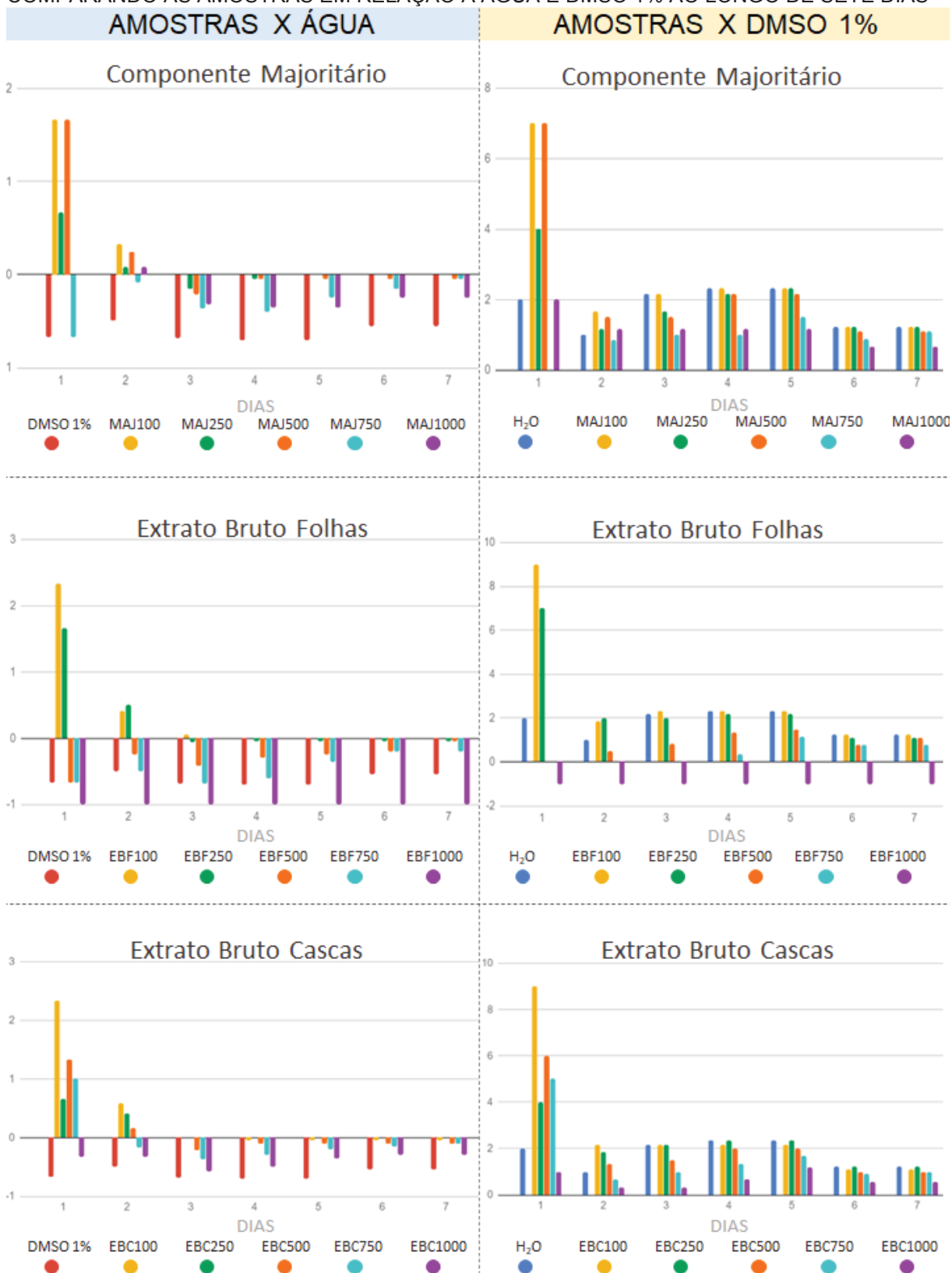
5.5.1.1 Avaliação da Atividade Alelopática em *Lactuca sativa*

5.5.1.1.1 Ensaio de Germinação

O ensaio avaliou o processo germinativo ao longo de sete dias, sendo possível estabelecer correlações com o período e grau de interferência ocasionado pelas amostras. O perfil de germinação das sementes de alface em contato com água foi empregado como padrão, alcançando totalidade de germinação das sementes (100%) ao quarto dia de exposição. Foram avaliados os extratos brutos etanólicos de folhas e cascas (EBF e EBC), componente majoritário dos extratos (MAJ) nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL, além de DMSO 1% (solvente empregado).

O Índice de Inibição ou Favorecimento de Germinação demonstra qualitativamente se há inibição ou estímulo da germinação ao longo dos dias comparativamente ao controle (água). A atividade das amostras foi também comparada ao solvente (DMSO 1%) com intuito de verificar se isoladamente interfere no processo germinativo. Observando os gráficos expostos na FIGURA 62, avalia-se a atividade das amostras e DMSO 1% em relação à água (lado esquerdo) e a atividade das amostras e água em relação ao DMSO 1% (lado direito).

FIGURA 62 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO OU FAVORECIMENTO NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* COMPARANDO AS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À ÁGUA E DMSO 1% AO LONGO DE SETE DIAS



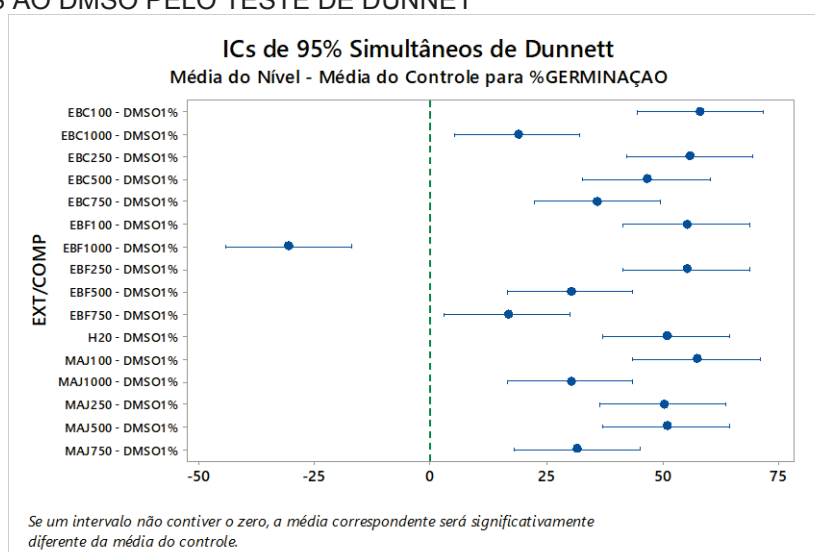
FONTE: A autora (2020)

NOTA: Valores abaixo de zero indicam inibição e valores acima de zero estímulo à germinação.
 LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Em relação à água, pode-se observar favorecimento (dias 1 e 2) e inibição (dias 1 a 7) ocasionada por MAJ, EBF e EBC em diferentes concentrações, além da clara inibição proporcionada por DMSO 1%. Portanto, um perfil realista da atividade das amostras exige a supressão da inibição ocasionada pelo solvente, anulando sua interferência. Assim, os índices das amostras são comparados diretamente à água, como observado ao lado direito da FIGURA 62.

Avaliando a atividade das amostras livres da influência do DMSO, fica evidente que MAJ é favorecedor da germinação de alface: MAJ100, MAJ250 e MAJ500 apresentam índice de favorecimento superior à água no dia 1, efeito suavizado no dia 2 e ausente nos dias subsequentes. Perfil similar é observado para os extratos brutos: EBF100 e EBF250 (dias 1 e 2), além de EBC100, EBC250, EBC500 e EBC750 no dia 1 e EBC100, EBC250 e EBC500 no dia 2. Nos dias 3 a 7, EBF250 e EBC250 mantiveram-se semelhantes à água, assim como MAJ100, acompanhada de MAJ250 a partir do dia 5. O restante das concentrações de amostras apresentaram índices de favorecimento inferiores à água e apenas EBF1000 apresentou índice de inibição ao longo dos sete dias. Portanto, pode-se verificar inibição da germinação de *Lactuca sativa* por EBF1000, desvinculada da atividade inibitória inerente ao solvente utilizado (DMSO). O grau inibitório ocasionado por EBF1000 pode ser confirmado ao observar o GRÁFICO 2 (Gráfico de Dunnett – 95% de confiança).

GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NAS AMOSTRAS COMPARADAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Avaliando a porcentagem média de germinação em relação ao DMSO 1% para os sete dias de ensaio, evidenciando maior grau de inibição quanto mais posicionado à esquerda, fica clara a inibição proporcionada por EBF1000. Ainda no GRÁFICO 2, é possível observar o favorecimento de germinação promovido por todas as outras amostras em relação ao DMSO 1%, posicionadas à direita.

A comparação entre grupos avalia as atividades de todas as amostras entre si para os sete dias de exposição, não apenas em relação a um referencial (como no Teste de Dunnet), como expõe a TABELA 15 (Teste de Tukey – 95% de confiança).

TABELA 15 – PERFIL DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa*: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA)

AMOSTRA	N	Média	Agrupamento		
EBC100	28	88,5714	A		
MAJ100	28	87,8571	A		
EBC250	28	86,4286	A		
EBF100	28	85,7143	A		
EBF250	28	85,7143	A		
H ₂ O	28	81,4286	A	B	
MAJ500	28	81,4286	A	B	
MAJ250	28	80,7143	A	B	
EBC500	28	77,1429	A	B	C
EBC750	28	66,4286		B	C
MAJ750	28	62,1429		C	D
EBF500	28	60,7143		C	D
MAJ1000	28	60,7143		C	D
EBC1000	28	49,2857			D
EBF750	28	7,1429			D E
DMSO1%	28	30,7143			E
EBF1000	28	0,0000			F

FONTE: A autora (2020).

NOTA: letras iguais na mesma linha evidenciam semelhança (Tukey, 95% de confiança).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

A atividade da água, considerada como padrão de germinação, não difere estatisticamente de MAJ250 e MAJ500, assim como MAJ100, EBF 100, EBF250, EBC 100 e EBC 250 µg/mL, além de EBC 500 µg/mL, que compartilham similaridades à água, evidenciando que o favorecimento observado não é significativo estatisticamente. Dentre os grupos estatisticamente diferentes da água e considerados inibidores, destaca-se o DMSO 1% e EBF 1000 µg/mL, com grau de inibição superior ao DMSO 1%, comprovando a atividade inibitória desta amostra (GRÁFICO 2).

O desenvolvimento das sementes nas referidas amostras foi comparado ao longo de sete dias após tratamento estatístico (Teste de Tukey – 95% de confiança), expondo a significância das influências observadas nas sementes comparando amostras individualmente (TABELA 16) e entre si (TABELA 17).

TABELA 16 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* AO LONGO DE SETE DIAS

Amostras	DIAS						
	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O	15 ^c	60 ^b	95 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
DMSO 1%	5 ^b	30 ^{ab}	30 ^{ab}	30 ^{ab}	30 ^{ab}	45 ^a	45 ^a
MAJ100	40 ^b	80 ^a	95 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
MAJ250	25 ^b	65 ^a	80 ^a	95 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
MAJ500	40 ^b	75 ^{ab}	75 ^{ab}	95 ^a	95 ^a	95 ^a	95 ^a
MAJ750	5 ^b	55 ^{ab}	60 ^a	60 ^a	75 ^a	85 ^a	95 ^a
MAJ1000	15 ^b	65 ^a	65 ^a	65 ^a	65 ^a	75 ^a	75 ^a
EBF100	50 ^b	85 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
EBF250	40 ^b	90 ^a	90 ^a	95 ^a	95 ^a	95 ^a	95 ^a
EBF500	5 ^c	45 ^{bc}	55 ^{ab}	70 ^{ab}	75 ^{ab}	80 ^{ab}	95 ^a
EBF750	5 ^d	30 ^{cd}	30 ^{cd}	40 ^{bc}	65 ^{ab}	80 ^a	80 ^a
EBF1000	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]	0 [*]
EBC100	50 ^b	95 ^a	95 ^a	95 ^a	95 ^a	95 ^a	95 ^a
EBC250	25 ^b	85 ^a	95 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
EBC500	35 ^b	70 ^{ab}	75 ^{ab}	90 ^a	90 ^a	90 ^a	90 ^a
EBC750	30 ^a	50 ^a	60 ^a	70 ^a	80 ^a	85 ^a	90 ^a
EBC1000	10 ^b	40 ^{ab}	40 ^{ab}	50 ^{ab}	65 ^{ab}	70 ^a	70 ^a

FONTE: A autora (2020)

NOTA: letras iguais na mesma linha evidenciam que não houve diferença significativa entre os dias de crescimento empregando um mesmo extrato ou solvente (Tukey, 95% de confiança).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Como exposto na TABELA 16, o desenvolvimento das sementes de alface em água não altera significativamente a partir do terceiro dia de exposição, atingindo 100% de germinação no quarto dia. Observa-se em DMSO 1% que a germinação máxima, atingida ao sexto dia, foi de 45%, indicando que isoladamente o solvente das amostras prejudica o processo germinativo. As amostras em sua maior concentração (1000 µg/mL) atingiram germinação máxima de 75% (MAJ), 0% (EBF) e 70% (EBC), indicando interferirem negativamente no processo germinativo de alface. Entretanto, deve-se considerar a provável influência de DMSO, como exposto pelo Índice de Inibição e Favorecimento. Já MAJ e EBF nas concentrações de 100 e 250 µg/mL e EBC nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL apresentaram porcentagens de germinação superiores ao controle nos dias 1 e 2.

A TABELA 17 compara, dia a dia, as influências das amostras entre si, diferente do exposto à TABELA 16 que compara a mesma amostra ao longo dos dias.

Para melhor visualização, MAJ, EBF e EBC foram comparados individualmente à água e DMSO 1%, observando as diferenças de porcentagem de germinação entre amostras ao longo os dias.

TABELA 17 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* AO LONGO DE SETE DIAS: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS

DIA	AMOSTRA (%G)																				
	H ₂ O DMSO 1%		MAJ (µg/mL)					H ₂ O DMSO 1%		EBF (µg/mL)					H ₂ O DMSO 1%		EBC (µg/mL)				
			100	250	500	750	1000			100	250	500	750	1000			100	250	500	750	1000
1	15 ^a	5 ^a	40 ^a	25 ^a	40 ^a	5 ^a	15 ^a	15 ^{ab}	5 ^a	50 ^{ab}	40 ^b	5 ^b	5 ^b	0 ^b	15 ^a	5 ^a	50 ^a	25 ^a	35 ^a	30 ^a	10 ^a
2	60 ^{ab}	30 ^b	80 ^{ab}	65 ^{ab}	75 ^{ab}	55 ^{ab}	65 ^{ab}	60 ^{ab}	30 ^{bc}	85 ^a	90 ^a	45 ^{bc}	30 ^{bc}	0 ^c	60 ^{abc}	30 ^c	95 ^{abc}	85 ^{abc}	70 ^{abc}	50 ^{abc}	40 ^{bc}
3	95 ^a	30 ^b	95 ^a	80 ^a	75 ^a	60 ^{ab}	65 ^{ab}	95 ^a	30 ^b	100 ^a	90 ^a	55 ^b	30 ^b	0 ^c	95 ^a	30 ^b	95 ^a	95 ^a	75 ^{ab}	60 ^{ab}	40 ^b
4	100 ^a	30 ^c	100 ^a	95 ^a	95 ^a	60 ^b	65 ^b	100 ^a	30 ^c	100 ^a	95 ^{ab}	70 ^b	40 ^c	0 ^d	100 ^a	30 ^c	95 ^{ab}	100 ^a	90 ^{ab}	70 ^{abc}	50 ^{bc}
5	100 ^a	30 ^c	100 ^a	100 ^a	95 ^a	75 ^{ab}	65 ^b	100 ^a	30 ^d	100 ^a	95 ^{ab}	75 ^{bc}	65 ^c	0 ^e	100 ^a	30 ^b	95 ^a	100 ^a	90 ^a	80 ^a	65 ^{ab}
6	100 ^a	45 ^b	100 ^a	100 ^a	95 ^a	85 ^a	75 ^b	100 ^a	45 ^b	100 ^a	95 ^a	80 ^a	80 ^a	0 ^c	100 ^a	45 ^b	95 ^a	100 ^a	90 ^a	85 ^a	70 ^{ab}
7	100 ^a	45 ^c	100 ^a	100 ^a	95 ^a	95 ^a	75 ^b	100 ^a	45 ^b	100 ^a	95 ^a	95 ^a	80 ^a	0 ^c	100 ^a	45 ^c	95 ^{ab}	100 ^a	90 ^{ab}	90 ^{ab}	70 ^{bc}

FONTE: A autora (2020).

NOTA: letras iguais na mesma linha nas colunas MAJ, EBF e EBC evidenciam que não houve diferença significativa entre os dias de crescimento (Tukey, 95% de confiança).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Observando a TABELA 17, pode-se verificar que há significância estatística na diferença de germinação em DMSO 1% quando comparado à água, comprovando sua interferência negativa ao processo germinativo. O mesmo é observado na maior concentração (1000 µg/mL) de MAJ, EBF e EBC, indicando prejuízo à germinação das sementes de alface. Apesar de MAJ, EBF e EBC indicarem porcentagem de germinação superior à observada em água nos dias 1 e 2, esta diferença não é significante.

A porcentagem de germinação pode não refletir diferenças do período necessário para alcançá-la, portanto dados complementares fornecem dados cinéticos sobre o processo germinativo (BORGHETTI; FERREIRA, 2004): velocidade

de germinação (VMG), o tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG), expostos na TABELA 18.

TABELA 18 – TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO, VELOCIDADE MÉDIA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS EM *Lactuca sativa*

	TMG	VMG	IVG
H₂O	4,68	0,21	7,63
DMSO 1%	1,80	0,55	2,87
MAJ100	4,79	0,21	9,38
MAJ250	4,60	0,22	7,94
MAJ500	4,47	0,22	8,73
MAJ750	3,72	0,27	5,51
MAJ1000	3,39	0,29	6,08
EBF100	4,86	0,21	10,09
EBF250	4,61	0,22	9,36
EBF500	3,68	0,27	5,26
EBF750	3,00	0,33	3,89
EBF1000	0	0	0
EBC100	4,67	0,21	10,07
EBC250	4,79	0,21	8,76
EBC500	4,25	0,24	8,17
EBC750	3,80	0,26	6,78
EBC1000	2,94	0,34	4,53

FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: TMG – Tempo Médio de Germinação; VMG – Velocidade Média de Germinação; IVG – Índice de Velocidade de Germinação; MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Pode-se destacar MAJ100, MAJ250, MAJ500, EBF100, EBF250, EBC100, EBC250 e EBC500 que apresentam Índice de Velocidade de Germinação relativamente superior às outras amostras (inclusive a água). Há indício de que estas amostras promovem início de germinação mais rápido quando comparadas às outras devido a um aumento no vigor destas sementes (BORGHETTI; FERREIRA, 2004), apesar de não exercerem influência significativa quando comparadas à água ao fim do experimento. Sementes de alface podem apresentar dormência devido à impermeabilidade para trocas gasosas e resistência mecânica, bloqueando o crescimento do embrião (LOPES; NASCIMENTO, 2012). Portanto, é possível que abreviem o período de dormência, refletindo em IVG superiores à água.

5.5.1.1.2 Teste de crescimento

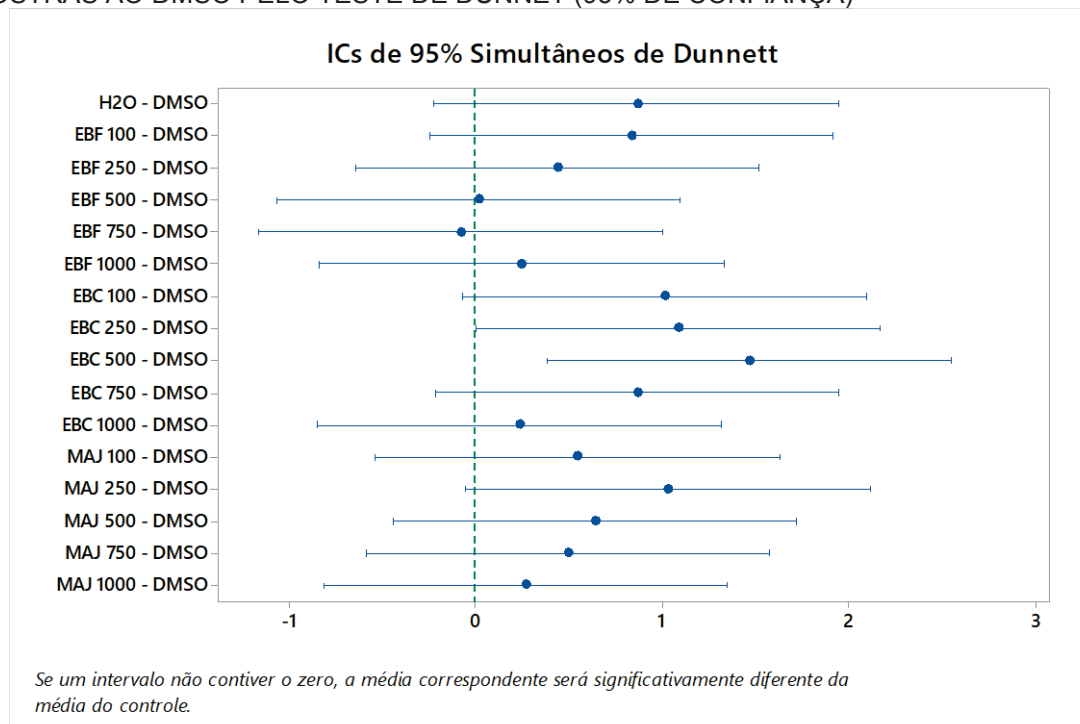
O ensaio avaliou o crescimento de radículas e hipocótilos de alface após sete dias de exposição. As medidas das radículas e hipocótilos em água foram

empregadas como padrão, comparando à interferência das amostras. Como foi observada a interferência do solvente (DMSO) no ensaio de germinação, foi considerada sua provável interferência no ensaio de crescimento.

5.5.1.1.2.1 Interferência em radículas

Em relação à avaliação da influência do DMSO ao desenvolvimento de radículas, a atividade das amostras e da água foram comparadas individualmente ao solvente (Teste de Dunnett – 95% de confiança) no GRÁFICO 3. Como observado anteriormente, o DMSO interfere negativamente no desenvolvimento: há desvio à direita, indicando que a água favorece o crescimento de radículas quando comparada ao DMSO. Portanto, é necessário considerar a influência do solvente na atividade das amostras empregadas: com exceção de EBF 750 µg/mL, todas as amostras apresentaram favorecimento ao crescimento de radículas em relação ao DMSO, com desvios à direita.

GRÁFICO 3 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE *Lactuca sativa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNETT (95% DE CONFIANÇA)

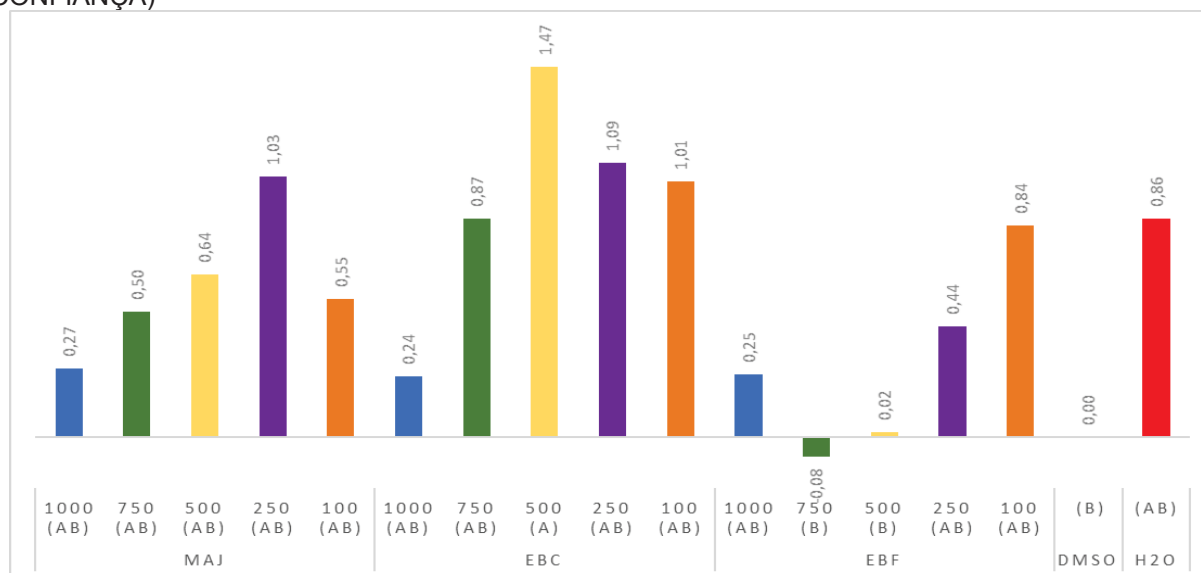


FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Ao comparar a atividade das amostras entre si em relação ao DMSO (GRÁFICO 4), foi possível avaliar a significância das influências (Teste de Tukey – 95% de confiança) observadas em radículas.

GRÁFICO 4 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE *Lactuca sativa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

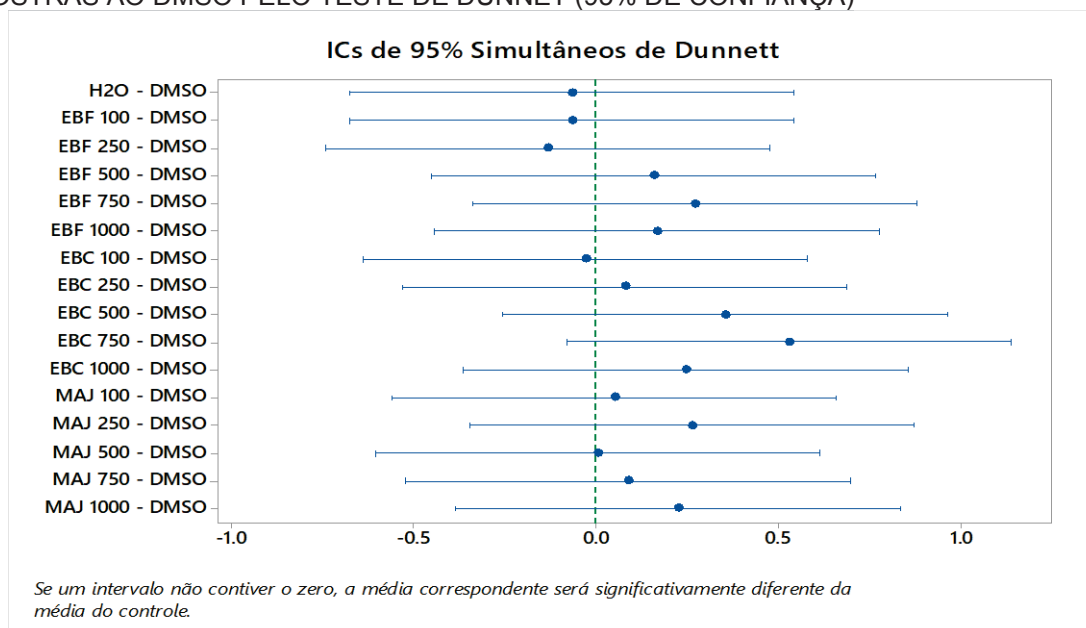
Comparando as atividades de todas as amostras entre si em relação do DMSO (GRÁFICO 4) foi observado que as influências são consideradas estatisticamente semelhantes. Apesar de EBC500 compor isoladamente um grupo (A), significativamente distinto ao DMSO (B), apresenta semelhança à água (AB). Portanto pode-se concluir que a influência positiva de EBC500 no crescimento de radículas de alface não é significativa estatisticamente.

5.5.1.1.2.2 Interferência em hipocótilos

O GRÁFICO 5 apresenta a comparação individual da atividade das amostras no desenvolvimento de hipocótilos (Teste de Dunnet – 95% de confiança) em relação ao DMSO. A influência de cada amostra foi avaliada pelo desvio proporcionado: quanto mais à esquerda, maior a inibição e quanto mais à direita, maior o favorecimento. Muitas amostras indicaram favorecimento quando comparadas à atividade do DMSO no hipocótilo, indicadas pelo desvio à direita. Porém o GRÁFICO

6, comparando todas as amostras entre si em relação ao DMSO (Teste de Tukey – 95% de confiança), indica que estas influências não são significantes. Portanto, apesar da aparente influência das amostras de alface, nenhuma altera significativamente o crescimento do hipocótilo.

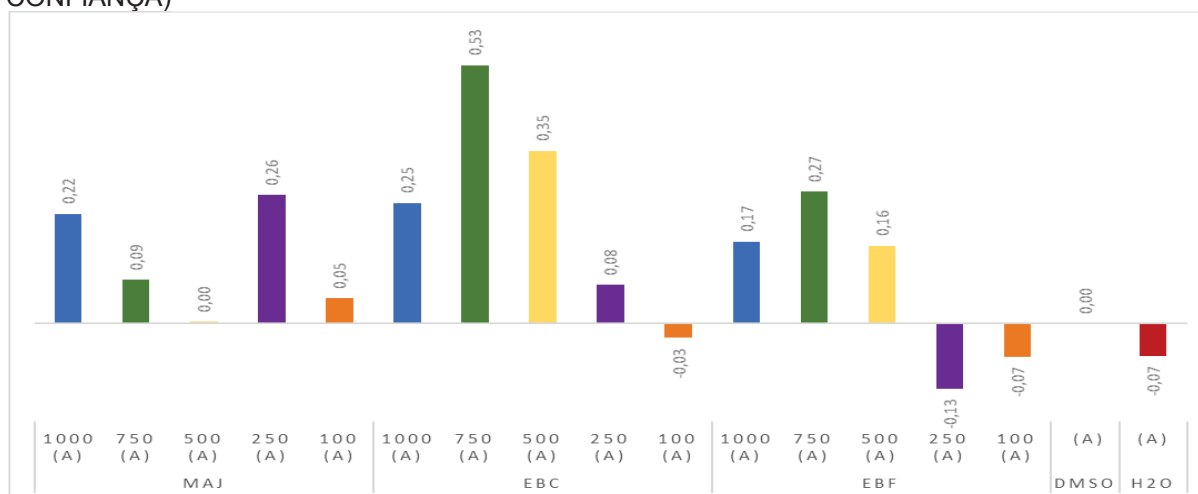
GRÁFICO 5 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE *Lactuca sativa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNETT (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

GRÁFICO 6 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE *Lactuca sativa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

5.5.1.2 Avaliação da Atividade Alelopática em *Allium cepa*

5.5.1.2.1 Ensaio de Germinação

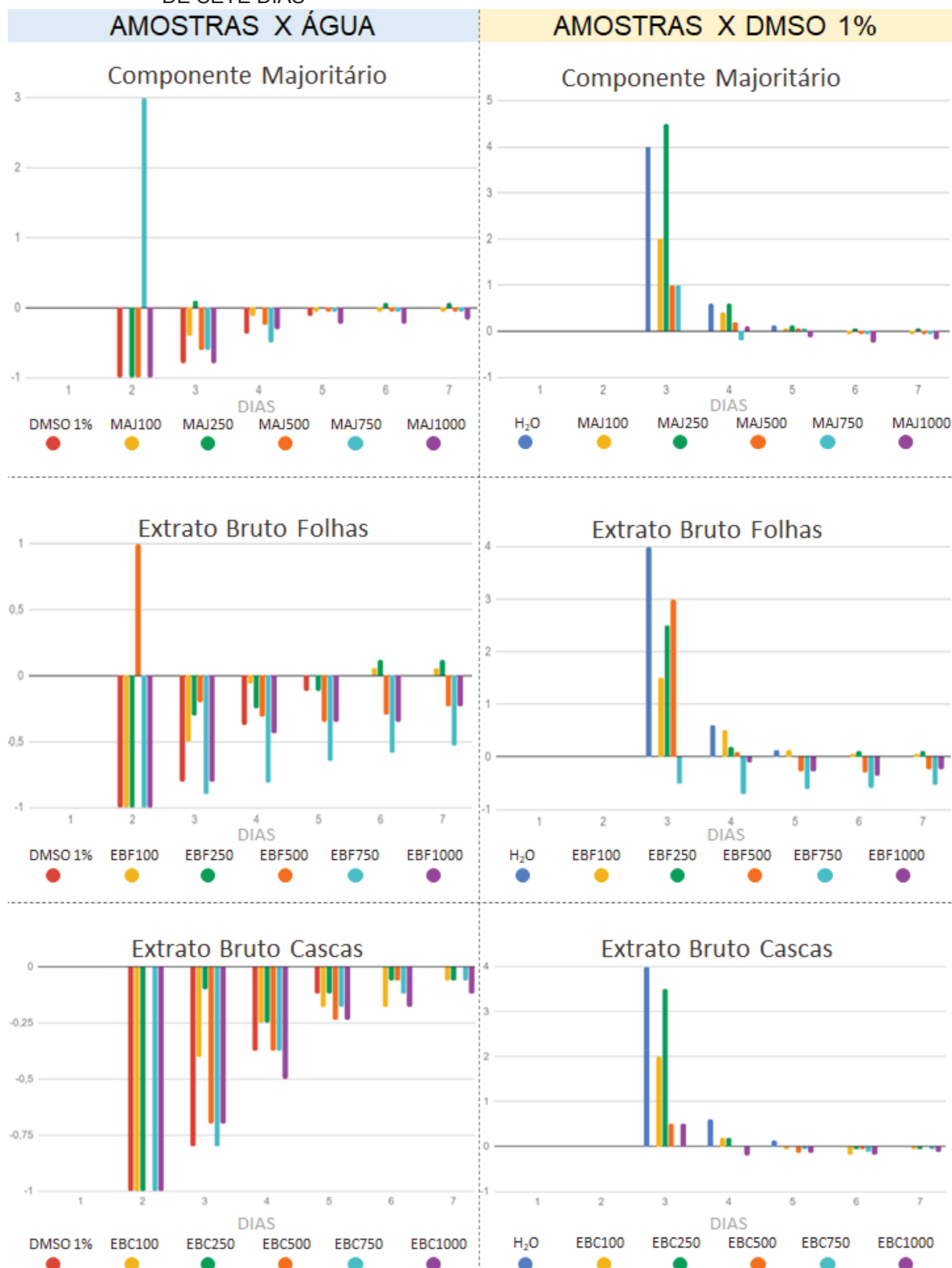
O ensaio avaliou o processo germinativo ao longo de sete dias, sendo possível estabelecer correlações com o período e grau de interferência ocasionado pelas amostras. O perfil de germinação das sementes de cebola em contato com água foi empregado como padrão, alcançando totalidade de germinação das sementes (85%) ao quinto dia de exposição. Foram avaliados os extratos brutos etanólicos de folhas e cascas (EBF e EBC), componente majoritário dos extratos (MAJ) nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL, além de DMSO 1% (solvente empregado).

O Índice de Inibição ou Favorecimento demonstra qualitativamente se há inibição ou estímulo da germinação ao longo dos dias comparativamente ao controle (água). A atividade das amostras foi também comparada ao solvente (DMSO 1%) com intuito de verificar se isoladamente interfere no processo germinativo. Observando os gráficos expostos na FIGURA 63, avalia-se a atividade das amostras e DMSO 1% em relação à água (lado esquerdo) e a atividade das amostras e água em relação ao DMSO 1% (lado direito).

Em relação à água, no primeiro dia de germinação (dia 2 do experimento), MAJ750 e EBF500 favoreceram a germinação de sementes de cebola e, de maneira geral, todas as outras amostras promoveram inibição, incluindo DMSO 1%, como observado em *Lactuca sativa*. Observa-se também que o grau de influência diminui ao longo dos dias, sendo modesto no último dia de ensaio podendo ser considerado praticamente nulo. A avaliação do perfil de atividade realista, a partir da supressão da atividade de DMSO 1%, pode ser observada no lado direito da FIGURA 63.

O perfil das amostras é sensivelmente alterado ao anular a interferência proporcionada por DMSO. Nenhum índice de favorecimento observado supera o controle (água), exceto MAJ250 (dia 3), podendo-se então concluir que não favoreceram a germinação das sementes de cebola. Contudo, índices de inibição são observados nas três amostras em diferentes intensidades, com destaque para EBF750. O grau inibitório ocasionado por estas amostras pode ser confirmado ao observar o GRÁFICO 7 (Dunnet, 95% de confiança).

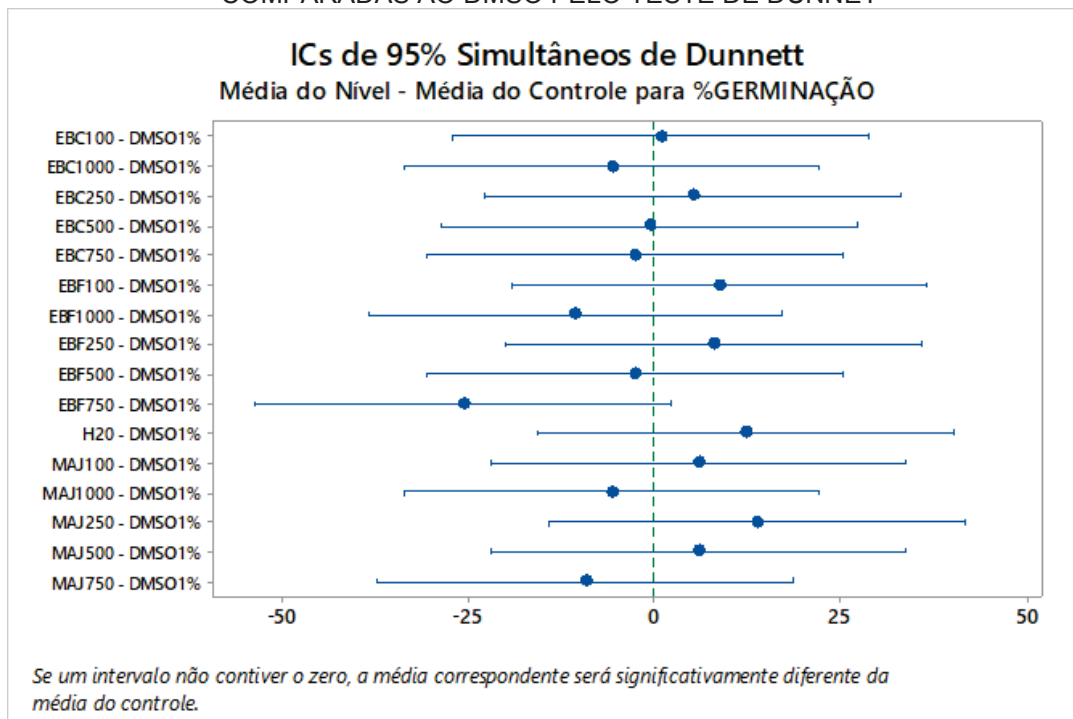
FIGURA 63 - ÍNDICE DE INIBIÇÃO OU FAVORECIMENTO NA GERMINAÇÃO DE *Allium cepa* COMPARANDO AS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À ÁGUA E DMSO 1% AO LONGO DE SETE DIAS



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Valores abaixo de zero indicam inibição e valores acima de zero estímulo à germinação.
 LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

GRÁFICO 7 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *Allium cepa* NAS AMOSTRAS COMPARADAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNET



FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

O GRÁFICO 7 (Dunnett, 95% de confiança) relaciona o grau de inibição ao DMSO, evidenciando maior grau de inibição quanto mais deslocado à esquerda, expondo o desfavorecimento proporcionado pelas amostras apontadas no Índice de Inibição. A comparação entre grupos (TABELA 19) permite a avaliação das atividades de todas as amostras entre si para os sete dias de exposição (Teste de Tukey – 95% de confiança), não em relação a apenas um referencial (como o teste de Dunnett).

Avaliando a atividade das amostras entre si, verifica-se que apenas EBF750 diferencia significativamente da germinação em água (padrão). Portanto, EBF750 foi capaz de ocasionar prejuízos ao processo germinativo de sementes de cebola, comprovando a atividade inibitória indicada no GRÁFICO 7, enquanto o solvente não ofereceu influência significativa estatisticamente.

O desenvolvimento das sementes nas referidas amostras foi comparado ao longo de sete dias após tratamento estatístico (Teste de Tukey – 95% de confiança), expondo a significância das influências observadas nas sementes comparando amostras individualmente (TABELA 20) e entre si (TABELA 21).

TABELA 19 - PERFIL DE GERMINAÇÃO DE *Allium cepa*: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA)

AMOSTRA	N	Média	Agrupamento
MAJ250	28	57,14	A
H ₂ O	28	55,71	A
EBF100	28	52,14	A
EBF250	28	51,43	A B
MAJ500	28	49,29	A B
MAJ100	28	49,29	A B
EBC250	28	48,57	A B
EBC100	28	44,29	A B
DMSO1%	28	43,57	A B
EBC500	28	42,86	A B
EBF500	28	40,71	A B
EBC750	28	40,71	A B
MAJ1000	28	37,86	A B
EBC1000	28	37,86	A B
MAJ750	28	34,29	A B
EBF1000	28	32,86	A B
EBF750	28	17,86	B

FONTE: A autora (2020)

NOTA: letras iguais na mesma linha evidenciam que não houve diferença significativa no desenvolvimento (Tukey, 95% de confiança).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

TABELA 20 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *Allium cepa* AO LONGO DE SETE DIAS

Amostras	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O	0 ^b	5 ^b	50 ^{ab}	80 ^a	85 ^a	85 ^a	85 ^a
DMSO 1%	0 ^c	0 ^c	10 ^c	50 ^b	75 ^{ab}	85 ^a	85 ^a
MAJ100	0 ^c	5 ^c	30 ^{bc}	70 ^{ab}	80 ^a	80 ^a	80 ^a
MAJ250	0 ^c	0 ^c	55 ^b	80 ^a	85 ^a	90 ^a	90 ^a
MAJ500	0 ^c	0 ^c	25 ^b	65 ^a	85 ^a	85 ^a	85 ^a
MAJ750	0 ^c	5 ^{bc}	10 ^{bc}	35 ^{abc}	60 ^{ab}	60 ^{ab}	70 ^a
MAJ1000	0 ^b	0 ^b	10 ^b	55 ^a	65 ^a	65 ^a	70 ^a
EBF100	0 ^b	0 ^b	25 ^b	75 ^a	85 ^a	90 ^a	90 ^a
EBF250	0 ^d	0 ^d	35 ^c	60 ^{bc}	75 ^{ab}	95 ^a	95 ^a
EBF500	0 ^c	10 ^{bc}	40 ^{abc}	55 ^{ab}	55 ^{ab}	60 ^a	65 ^a
EBF750	0 ^c	0 ^c	5 ^c	15 ^{bc}	30 ^{ab}	35 ^{ab}	40 ^a
EBF1000	0 ^b	0 ^b	10 ^b	45 ^a	55 ^a	55 ^a	65 ^a
EBC100	0 ^b	0 ^b	30 ^{ab}	60 ^a	70 ^a	70 ^a	80 ^a
EBC250	0 ^b	0 ^b	45 ^{ab}	60 ^a	75 ^a	80 ^a	80 ^a
EBC500	0 ^c	5 ^c	15 ^{bc}	50 ^{abc}	65 ^{ab}	80 ^a	85 ^a
EBC750	0 ^b	0 ^b	10 ^b	50 ^a	70 ^a	75 ^a	80 ^a
EBC1000	0 ^b	0 ^b	15 ^b	40 ^{ab}	65 ^a	70 ^a	75 ^a

FONTE: A autora (2020).

NOTA: letras iguais na mesma linha evidenciam que não houve diferença significativa entre os dias de crescimento empregando um mesmo extrato ou solvente (Tukey, 95% de confiança).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Como exposto na TABELA 20, o desenvolvimento das sementes de cebola em água não altera significativamente a partir do dia 4 de exposição, atingindo máxima porcentagem de germinação (85%) no dia 5. Diferente do observado em *Lactuca sativa*, DMSO 1% não provocou alterações na porcentagem de germinação em *Allium cepa*, apesar de oferecer aparente atraso e lentidão ao processo. Diversas amostras foram capazes de interferir negativamente na porcentagem de germinação: EBF 750, EBF500, EBF1000, MAJ 750, MAJ 1000 e EBC1000. A significância desta interferência é avaliada quando se compara amostras entre si, como na TABELA 21.

A TABELA 21 compara, dia a dia, as influências das amostras entre si, diferente do exposto à TABELA 20 que compara a mesma amostra ao longo dos dias. Para melhor visualização, MAJ, EBF e EBC foram comparados individualmente à água e DMSO 1%, observando as diferenças de porcentagem de germinação entre amostras ao longo os dias.

TABELA 21 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE *Allium cepa* AO LONGO DE SETE DIAS: COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS

DIA	AMOSTRA (%G)																					
	H ₂ O	DMSO 1%	MAJ (µg/mL)					H ₂ O	DMSO 1%	EBF (µg/mL)					H ₂ O	DMSO 1%	EBC (µg/mL)					
			100	250	500	750	1000			100	250	500	750	1000			100	250	500	750	1000	
1	0	0	0	0	0 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5 ^a	0 ^a	5 ^a	0 ^a	0 ^a	5 ^a	0 ^a	5 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	10 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	5 ^a	0 ^a	0 ^a	10 ^a	5 ^a	0 ^a	0 ^a
3	50 ^{ab}	25 ^b	30 ^{ab}	55 ^a	25 ^{ab}	10 ^b	10 ^b	50 ^a	10 ^{ab}	25 ^{ab}	35 ^{ab}	40 ^{ab}	5 ^b	10 ^{ab}	50 ^a	10 ^a	30 ^a	40 ^a	15 ^a	10 ^a	15 ^a	15 ^a
4	80 ^a	75 ^a	70 ^a	80 ^a	65 ^a	35 ^a	55 ^a	80 ^a	50 ^{ab}	75 ^a	60 ^a	55 ^{ab}	15 ^b	45 ^{ab}	80 ^a	50 ^a	60 ^a	60 ^a	50 ^a	50 ^a	40 ^a	40 ^a
5	85 ^a	85 ^a	80 ^a	85 ^a	85 ^a	60 ^a	65 ^a	85 ^a	75 ^a	85 ^a	75 ^a	55 ^{ab}	30 ^b	55 ^{ab}	85 ^a	75 ^a	70 ^a	80 ^a	65 ^a	70 ^a	65 ^a	65 ^a
6	85 ^a	85 ^a	80 ^a	90 ^a	85 ^a	70 ^a	70 ^a	85 ^{ab}	85 ^{ab}	90 ^{ab}	95 ^a	60 ^{abc}	35 ^c	05 ^{bc}	85 ^a	85 ^a	70 ^a	90 ^a	80 ^a	75 ^a	70 ^a	70 ^a
7	85 ^a	85 ^a	80 ^a	90 ^a	85 ^a	70 ^a	70 ^a	85 ^a	85 ^a	90 ^a	95 ^a	65 ^{ab}	40 ^b	65 ^{ab}	85 ^a	85 ^a	80 ^a	95 ^a	85 ^a	80 ^a	75 ^a	75 ^a

FONTE: A autora (2020).

NOTA: letras iguais na mesma linha nas colunas MAJ, EBF e EBC evidenciam que não houve diferença significativa entre os dias de crescimento (Tukey, 95% de confiança).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Nota-se que, apesar de observada menor porcentagem máxima de germinação em EBF 750, EBF500, EBF1000, MAJ 750, MAJ 1000 e EBC1000, apenas EBF750 apresenta significativa influência, interferindo negativamente no processo de germinação das sementes de cebola.

Foi observado que DMSO 1% não interferiu no total de sementes de cebola germinadas em comparação à água, mas influi na cinética do processo de germinação. Como a porcentagem de germinação não reflete o tempo necessário para alcançá-la, a análise de parâmetros como a velocidade de germinação (VMG), o tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG) podem esclarecer esta influência (BORGHETTI; FERREIRA, 2004) (TABELA 22).

TABELA 22 – TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO, VELOCIDADE MÉDIA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS EM *Allium cepa*

	TMG	VMG	IVG
H₂O	3,59	0,28	4,12 ^a
DMSO1%	3,05	0,33	2,86 ^a
MAJ100	3,25	0,31	3,54 ^a
MAJ250	3,71	0,27	4,16 ^a
MAJ500	3,33	0,30	3,39 ^a
MAJ750	2,38	0,42	2,33 ^a
MAJ1000	2,60	0,38	2,55 ^a
EBF100	3,52	0,28	3,60 ^a
EBF250	3,49	0,29	3,55 ^a
EBF500	2,59	0,39	3,12 ^a
EBF750	1,28	0,78	1,15 ^a
EBF1000	2,27	0,44	2,20 ^a
EBC100	2,96	0,34	3,10 ^a
EBC250	3,20	0,31	3,49 ^a
EBC500	2,96	0,34	2,92 ^a
EBC750	2,84	0,35	2,69 ^a
EBC1000	2,63	0,38	2,52 ^a

FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: TMG – Tempo Médio de Germinação; VMG – Velocidade Média de Germinação; IVG – Índice de Velocidade de Germinação; MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

É observado que as amostras (exceto MAJ250) apresentam IVG inferior à água (controle), inferindo que diminuem o vigor das sementes de cebola, destacando-se EBF750, apresentando IVG sensivelmente inferior. A interferência de EBF750 vai além da alteração de vigor, refletindo em significativa diminuição na porcentagem de germinação.

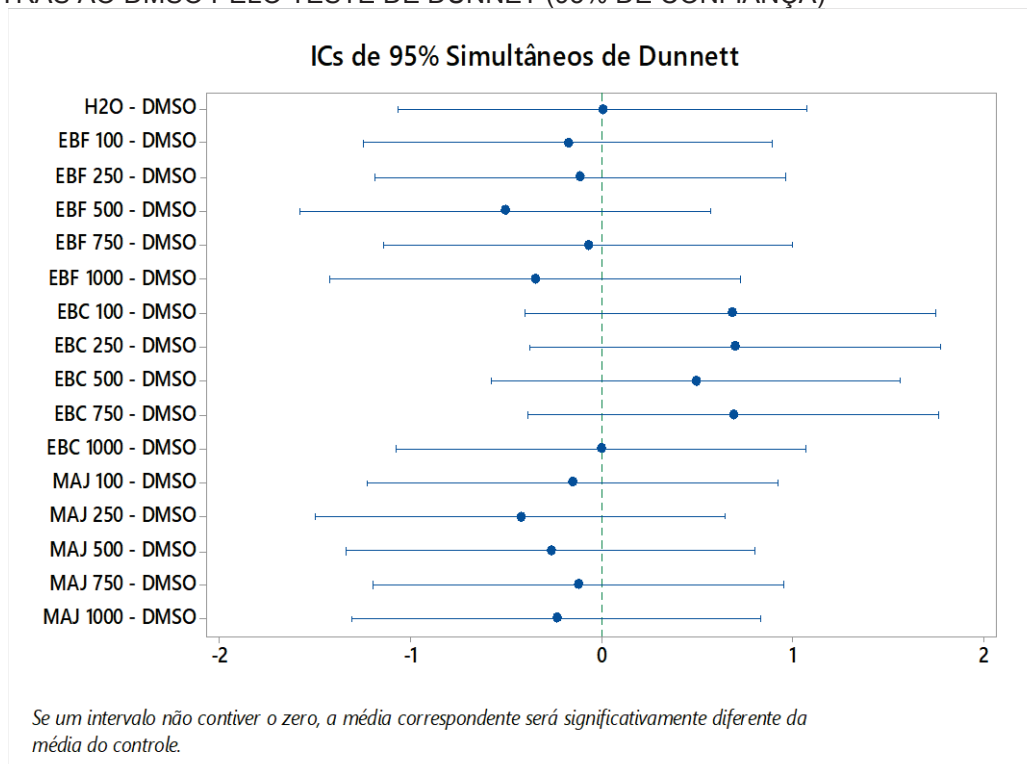
5.5.1.2.2 Teste de Crescimento

O ensaio avaliou o desenvolvimento de radículas e hipocótilos de cebola após quinze dias de exposição. As medidas das radículas e hipocótilos em água foram empregadas como padrão, comparando à interferência das amostras.

5.5.1.2.2.1 Interferência em radículas

Em relação à avaliação da influência do DMSO ao desenvolvimento de radículas, a atividade das amostras e da água foram comparadas individualmente ao solvente (Teste de Dunnett – 95% de confiança) no GRÁFICO 8. Pode-se observar a influência de cada amostra e controle em relação ao solvente: quanto maior o desvio à esquerda, maior a inibição e quanto maior o desvio à direita, maior o favorecimento. No GRÁFICO 9, a influência ilustrada pelo GRÁFICO 8 é avaliada em relação a sua significância (Teste de Tukey - 95% de confiança).

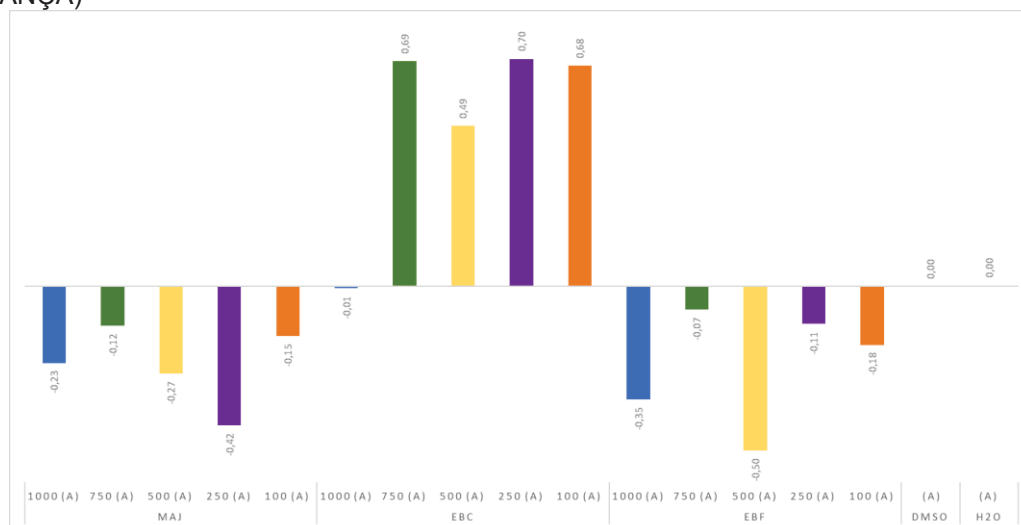
GRÁFICO 8 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE *Allium Cepa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNETT (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

GRÁFICO 9 – DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE *Allium cepa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

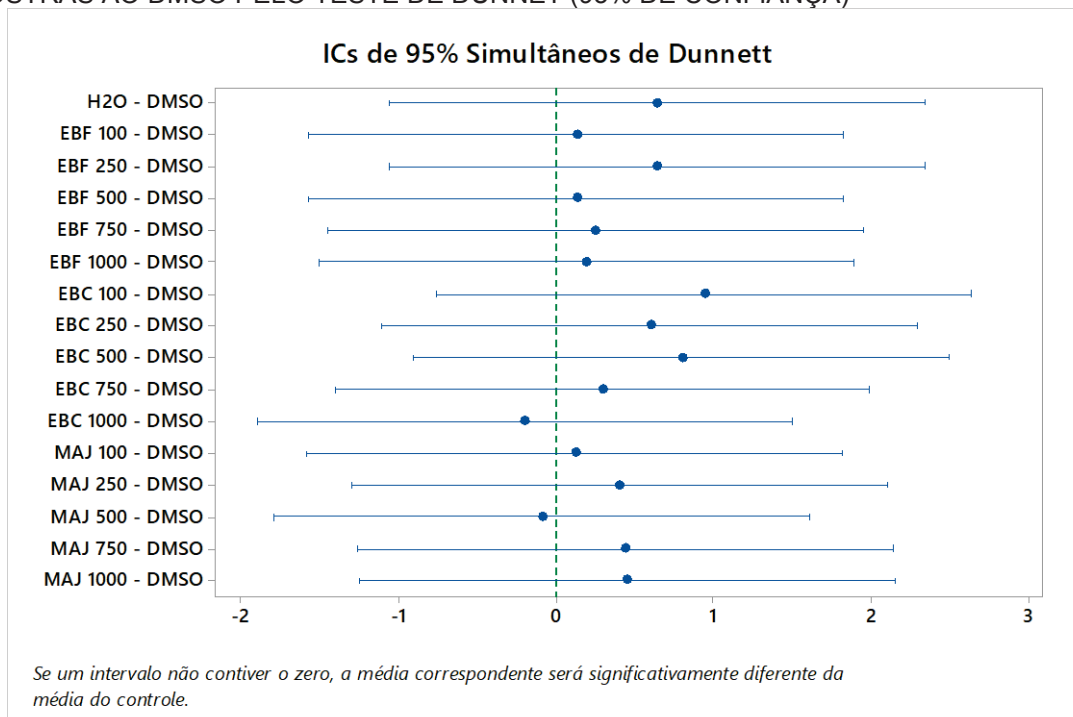
LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Apesar de serem observadas influências inibidoras de diversas amostras em relação ao DMSO (GRÁFICO 8), elas não apresentam significância estatística, uma vez que são classificadas no mesmo grupo pelo Teste de Tukey (95% de confiança) (GRÁFICO 9). Portanto, não foram observadas influências significantes ao desenvolvimento de radículas de *Allium cepa*.

5.5.1.2.2.2 Interferência em hipocótilos

O GRÁFICO 10 apresenta a comparação individual da atividade das amostras e controle no desenvolvimento de hipocótilos em relação ao solvente (Teste de Dunnet – 95% de confiança). A influência de cada amostra em relação à água foi avaliada pelo desvio proporcionado: quanto mais à esquerda, maior a inibição e quanto mais à direita, maior o favorecimento. A significância das influências é avaliada no GRÁFICO 11, ao comparar as amostras e controle entre si em relação ao DMSO (Teste de Tukey – 95% de confiança).

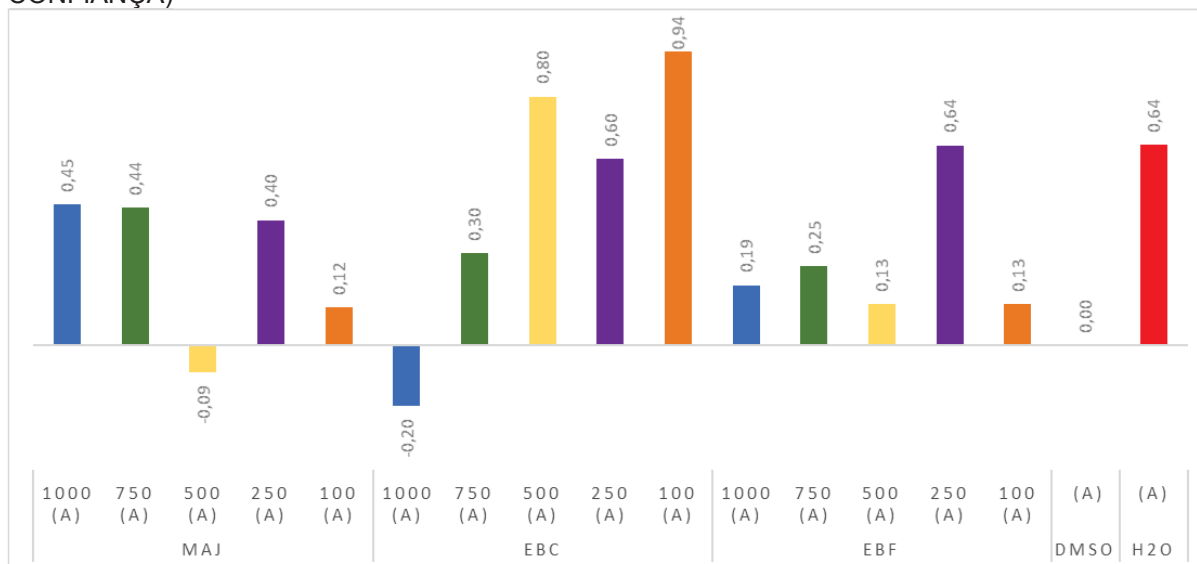
GRÁFICO 10 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE *Allium cepa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS AO DMSO PELO TESTE DE DUNNETT (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

GRÁFICO 11 – DESENVOLVIMENTO DE HIPOCÓTILOS DE *Allium cepa*: COMPARAÇÃO DE AMOSTRAS ENTRE SI EM RELAÇÃO AO DMSO AGRUPADOS PELO TESTE DE TUKEY (95% DE CONFIANÇA)



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: MAJ – Componente majoritário; EBF – Extrato Bruto Etanólico de Folhas; EBC – Extrato Bruto Etanólico de Cascas; Concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Apesar de MAJ500 e EBC1000 aparentarem inibição ao desenvolvimento de hipocótiros (GRÁFICO 10), nenhuma influência é considerada significativa (Teste de

Tukey – 95% de confiança), sendo equiparadas ao desenvolvimento em água (GRÁFICO 11). Portanto, o desenvolvimento de hipocótilos de *Allium cepa* não foi influenciado pelas amostras.

5.5.2 Avaliação da atividade citotóxica em linhagens tumorais

Extratos brutos e frações de *Cestrum intermedium* foram avaliados em relação a atividade citotóxica a linhagens tumorais humanas (glioblastoma, câncer de cólon, linfoma, leucemia mieloide aguda e crônica e carcinoma pulmonar). Como controle positivo, foi empregado o quimioterápico Doxorrubicina.

Em Szabo (2015) foi determinada a atividade tóxica de extratos e frações de *Cestrum intermedium* em *Artemia salina*, apresentando toxicidade as frações clorofórmio e acetato de etila de folhas e cascas. A toxicidade a este microcrustáceo apresenta boa correlação à atividade citotóxica, sendo este bioensaio utilizado como preditor de citotoxicidade (SIQUEIRA *et al.*, 1998). A TABELA 23 traz a IC₅₀ (µg/mL) dos extratos e frações avaliados nas linhagens celulares cancerígenas em comparação ao controle, destacando os menores IC₅₀ (µg/mL).

TABELA 23 – ATIVIDADE CITOTÓXICA (IC₅₀ (µg/mL)) DAS AMOSTRAS EM LINHAGENS TUMORAIS

Amostra		LINHAGEM CELULAR					
		87MG	HT29	U937	Thp1	K562	H460
Doxorrubicina		0,055	0,12	0,087	0,21	0,041	< 0,031
Cascas	EB	125,5	133,7	125	125	125,5	150,4
	H	75,5	70,7	55,2	50,4	45,3	51,2
	C	12,5	12,5	25	25,7	33	117,5
	AE	15,0	25,4	25,2	12,5	25,4	33,5
	R	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Folhas	EB	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	H	42,3	40	33,2	25	25	112
	C	33	33,2	32,5	32,6	33,2	25
	R	>500	>500	>500	>500	>500	>500

FONTE: A autora (2020)

NOTA: destacadas amostras com atividade citotóxica de acordo com Itharat et al. (2004).

LEGENDA: 87MG – linhagem epitelial (glioblastoma); HT29 – linhagem epitelial (câncer de cólon); U937 – linhagem monocítica (linfoma); Thp1 – linhagem monocítica (leucemia mieloide aguda); K562 – linhagem linfoblástica (leucemia mieloide crônica); H460 – linhagem pleural (carcinoma pulmonar); EB – Extrato Bruto; H – fração hexano; C – fração clorofórmio; AE – fração acetato de etila; R – fração remanescente.

Observando a atividade do controle (doxorrubicina), a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos e frações, expressa em IC₅₀ (µg/mL), é menos potente, apesar de eficaz. Porém, conforme estabelecido pelo Instituto Nacional Americano do Câncer

(NCI), extratos vegetais são considerados ativos em avaliação preliminar quando a dose efetiva é igual ou inferior a 30 µg/mL ($IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) (ITHARAT et al., 2004). A partir desta ótica, os resultados indicam atividade citotóxica a diversas linhagens cancerígenas, principalmente as frações tóxicas a *Artemia salina* em Szabo (2015). Por outro lado, Cos et al. (2006) considera extratos vegetais ativos quando apresentam $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, englobando a maior parte das amostras. De maneira geral, podemos salientar as atividades das frações clorofórmio e acetato de etila das cascas, além de hexano e clorofórmio das folhas.

Especialmente, dentre as atividades observadas em frações de cascas, destacam-se na linhagem de glioblastoma (87MG) (clorofórmio e acetato de etila), câncer de cólon (HT29) (clorofórmio) e leucemia mieloide aguda (Thp1) (acetato de etila). A partir de cascas, Szabo (2015) isolou o triterpeno ligado a ácido graxo Palmitato de Lupeol, reportado por apresentar atividade citotóxica *in vitro* em células HT29 em Silva et al. (2017). O lupeol já foi isolado de frações hexano e clorofórmio de extratos vegetais (LAKSHMI et al., 2014a; LAKSHMI et al., 2014b), podendo estar relacionado à atividade observada, especialmente na fração clorofórmio das cascas.

O componente majoritário apresenta esqueleto β -carbolínico (alcaloide indólico), relacionado a atividades antitumorais dentre outras propriedades farmacológicas (CAO et al., 2007). O componente majoritário (obtido da fração acetato de etila do extrato bruto pós-cetônico das cascas) está presente em todos os extratos, sendo um provável componente da fração acetato de etila das folhas.

Portanto, confirmou-se o perfil de toxicidade delineado anteriormente com bioensaios em *Artemia salina*, verificando a citotoxicidade preliminar de extratos e frações de *Cestrum intermedium* em células tumorais.

5.5.3 Avaliação do potencial leishmanicida

O protozoário *Leishmania infantum* é o agente etiológico mais comum da leishmaniose visceral, uma antropozoonose de notificação compulsória que provoca cerca de 50.000 óbitos ao ano no mundo, taxa superada apenas pela malária dentre doenças parasitárias. A transmissão ocorre através da picada de mosquitos infectados, sendo o cão doméstico o principal reservatório de infecção em humanos, devido ao intenso parasitismo cutâneo e estreito relacionamento com o homem. Os animais infectados sofrem eutanásia, sendo o tratamento proibido com intuito de evitar

a seleção de parasitas resistentes ao medicamento, também utilizado em humanos (BOECHAT, 2015).

5.5.3.1 Toxicidade sobre promastigotas e macrófagos

A atividade tóxica dos extratos e frações de folhas e cascas de *Cestrum intermedium* foi avaliada em promastigotas *L. infantum*. Devido à infecção deste protozoário em macrófagos, a toxicidade de amostras foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 sadios, posteriormente avaliando a produção de NOSi em macrófagos infectados. Os resultados das atividades de extratos e frações sobre promastigotas e macrófagos, expressos em IC₅₀ (µg/mL), em comparação ao controle positivo (miltefosina) encontram-se na TABELA 24.

TABELA 24 - IC₅₀ (µg/mL) DOS EXTRATOS DE FOLHAS E CASCAS DE *C. intermedium* SOBRE *Leishmania infantum* e macrófagos RAW 264.7

Amostra		<i>L. infantum</i>	Macrófagos RAW 264.7
Miltefosina		1,47	3,23
Cascas	EB	178,6	227,3
	H	125,3	156
	C	78,3	57,3
	AE	37,3	41,3
	R	>250	>250
Folhas	EB	150	168,3
	H	56,2	74,5
	C	75,3	83,2
	R	>250	>250

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: EB – Extrato Bruto; H – fração hexano; C – fração clorofórmio; AE – fração acetato de etila; R – fração remanescente.

Sob a perspectiva de Cos et al. (2006), que considera extratos vegetais ativos quando apresentam IC₅₀ < 100 µg/mL, novamente podemos destacar a toxicidade das frações clorofórmio (folhas e cascas) e acetato de etila das cascas. No período de realização deste ensaio, o componente majoritário não havia sido isolado e o quantitativo de fração acetato de etila das folhas não era suficiente, portanto não há dados referentes à atividade citotóxica destas amostras. Porém, o componente majoritário apresenta esqueleto β-carbolínico (alcaloide indólico), relacionado à atividades antiparasitária contra *Leishmania*, dentre outras propriedades farmacológicas (CAO et al., 2007). O componente majoritário (obtido da fração acetato de etila do extrato bruto pós-cetônico das cascas) está presente em todos os extratos, sendo um provável componente da fração acetato de etila das folhas. Empregando a

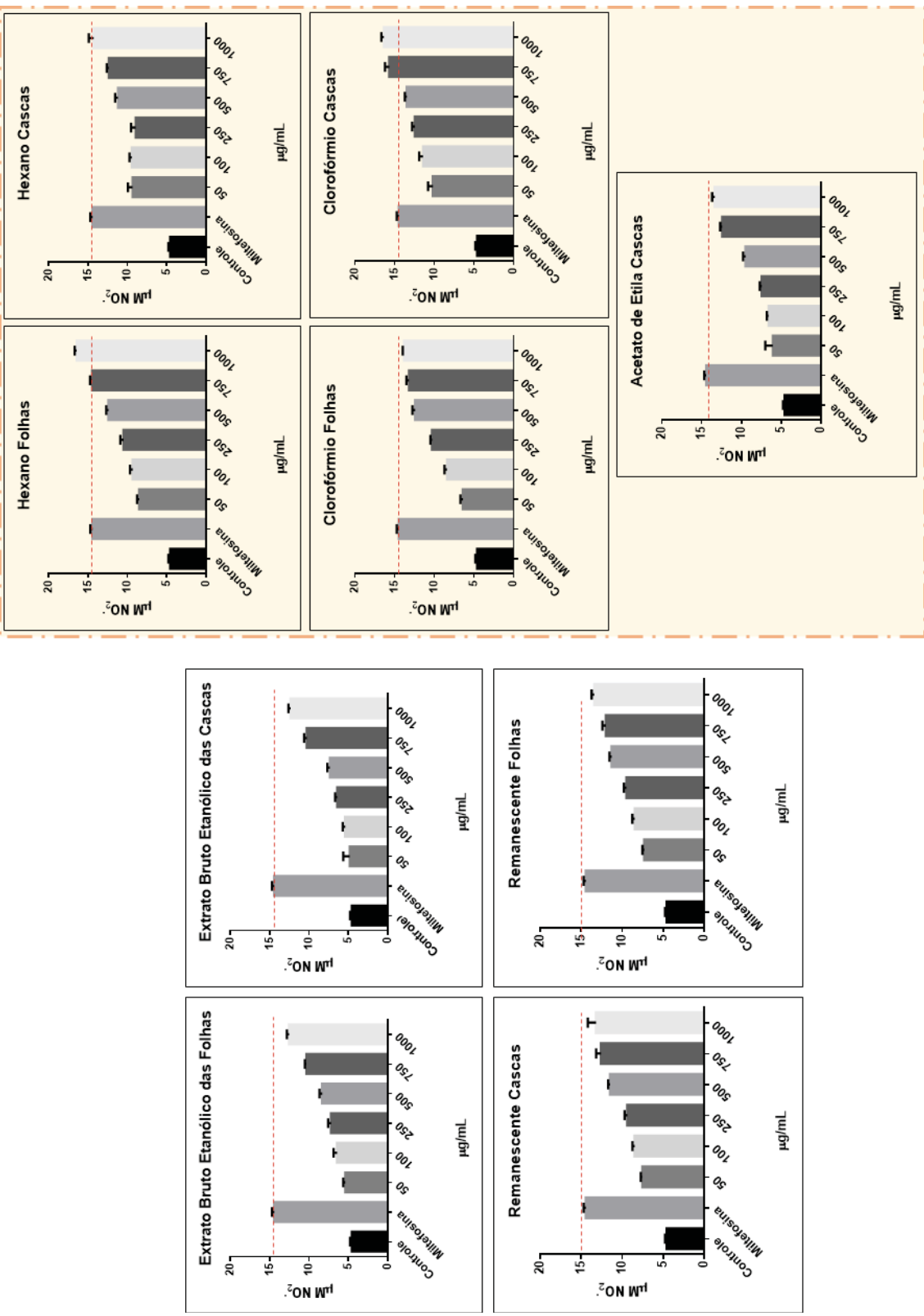
classificação de efetividade de atividade leishmanicida para extratos vegetais, considerando baixa atividade $30 < IC_{50} \leq 60 \mu\text{g/mL}$ (EHATA et al., 2012), podemos destacar a fração acetato de etila das cascas. Gilbert e Favoreto (2005) reportam alcaloides indólicos como princípios ativos que atacam diretamente o parasito (*Leishmania* spp.): por diferentes mecanismos, coronaridina, fitoalexina, anigorufona.

Apesar de muito aquém da atividade do controle positivo, observa-se que as amostras apresentam superior toxicidade em promastigotas do que em macrófagos (exceto clorofórmio das cascas). Portanto, nesta avaliação preliminar de toxicidade, observa-se que os extratos e frações não apresentam atividade seletiva (afetando protozoários e células), assim como a fração clorofórmio das cascas é mais efetiva em células sadias (macrófagos RAW 264.7) do que no organismo-teste.

5.5.3.2 Produção de Óxido Nítrico Sintetase Induzida (NOSi) em macrófagos infectados

A produção de NOSi, expressa pela produção de óxido nítrico (NO), está relacionada à ativação de macrófagos, contemplando um dos mecanismos de defesa mediados por estas células (SOAREZ-BEZERRA et al., 2004), indicando estímulo de sua atividade leishmanicida. *Leishmania* spp. não apresentam defesas contra radicais livres de oxigênio, como óxido nítrico (GILBERT; FAVORETO, 2005). O perfil de atividade de diversos extratos e frações sobre macrófagos infectados e sua produção de NOSi, expressos em $\mu\text{M NO}_2^-$, está ilustrado na FIGURA 64.

FIGURA 64 – INTERFERÊNCIA DE *Cestrum intermedius* NA PRODUÇÃO DE NOSI EM MACRÓFAGOS INFECTADOS ($\mu\text{M NO}_2^-$)



FONTE: A autora (2020).

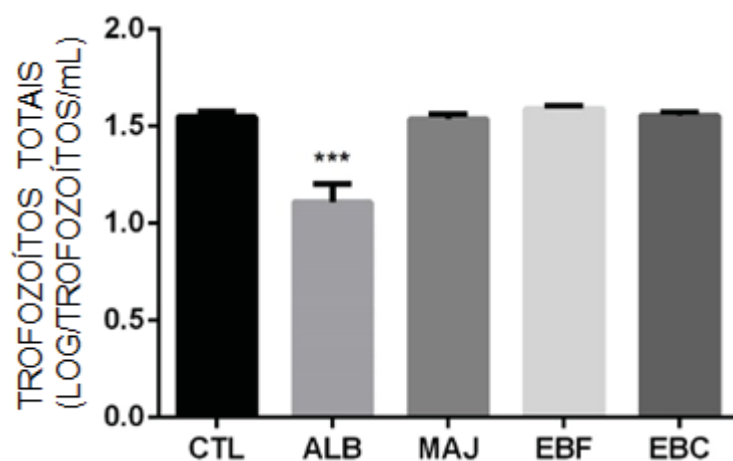
Pode-se observar que, de maneira geral, há uma relação dose-dependente entre as concentrações de amostras e acúmulo de NO_2^- , inferindo que estimula a resposta imune nos macrófagos infectados. Pode-se trazer destaque às frações hexano de folhas e clorofórmio das cascas, ultrapassando a concentração de NO_2^- observada pelo controle positivo (miltefosina), assim como hexano e clorofórmio das folhas, que se aproximam aos níveis de NO_2^- observados no controle.

As atividades tóxicas a *Leishmania infantum* e estímulo de resposta imune aos macrófagos infectados indicam o perfil preliminar leishmanicida de *Cestrum intermedium*, especialmente as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. O mesmo foi observado no ensaio de citotoxicidade em linhagens tumorais, reproduzindo o perfil de toxicidade previsto no ensaio preliminar em *Artemia salina* (SIQUEIRA *et al.*, 1998), realizado por Szabo (2015).

5.5.4 Avaliação da toxicidade em *Giardia intestinalis*

O protozoário flagelado *Giardia intestinalis* (*G. lamblia* ou *G. duodenalis*) é um parasita intestinal, responsável por ocasionar giardíase em indivíduos que ingerem seus cistos. A principal forma de transmissão desta parasitose é pela ingestão de água contaminada, sendo que a cloração não é um método eficiente para inativação dos cistos, sendo necessária a fervura para consumo seguro (PINHEIRO, 2019; SANTANA *et al.*, 2014).

Devido ao elevado custo dos insumos empregados, como meios de cultura que simulam o ambiente físico-químico do intestino delgado (MISSINA *et al.* 2018), foi realizada uma avaliação preliminar da atividade de *Cestrum intermedium*, empregando os extratos brutos de folhas e cascas, assim como o componente majoritário. A influência das amostras na adesão de trofozoítos foi comparada à do antiparasitário albendazol, sendo expressas no GRÁFICO 12.

GRÁFICO 12 – ATIVIDADE DE *Cestrum intermedium* NA ADESÃO DE TROFOZOÍTOS

FONTE: A autora.

LEGENDA: CLT – controle; ALB – Albendazol; MAJ – componente majoritário; EBF – extrato bruto das folhas; ECF – extrato bruto das cascas.

NOTA: $p < 0,001$ (***).

A adesão de trofozoítos às paredes do intestino delgado está diretamente associada à persistência da população protozoária no hospedeiro (MISSINA et al., 2018). Portanto, distúrbios na efetividade de adesão podem ser interpretados como potencial atividade na infecção por *Giardia*. As amostras de *Cestrum intermedium* não apresentaram interferência na adesão dos trofozoítos de *Giardia intestinalis*, exibindo atividade comparável ao controle negativo (meio de cultivo).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Incentivado pela ampla descrição do quadro hepatotóxico ocasionado por *Cestrum intermedium* em animais de importância pecuária e pertencimento à família e gênero relacionados à toxicidade e pelo potencial farmacológico, o estudo da espécie teve oportunidade de explorar propriedades inéditas. Iniciado em “Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidantes, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae)”, a investigação da espécie contribuiu com informações sobre as características físico-químicas, constituição química e atividades biológicas até então desconhecidas à comunidade científica para esta espécie.

A caracterização físico-química do material vegetal estabeleceu parâmetros para a espécie, podendo auxiliar em sua identificação ao comparar perfis, sendo um método farmacopeico para controle de qualidade de drogas vegetais. A caracterização morfoanatômica de *Cestrum intermedium* possibilitou a comparação a outras *Cestrum*, contribuindo para a diferenciação entre espécies e estabelecendo padrão de comparação a futuras caracterizações. Foi confirmada a presença de marcadores quimiotaxonômicos relacionados à toxicidade da família e gênero (alcaloides), através do ensaio histoquímico.

Contribuindo com o compilado de dados acerca da espécie, foram identificados metabólitos: palmitato de lupeol (triterpeno) (SZABO, 2015), alantoína (alcaloide purínico), carbonato de sódio e nitrato de potássio (sais inorgânicos). O componente majoritário, isolado de folhas e cascas, apresenta esqueleto β -carbolínico, indicando pertencer à classe de alcaloides indólicos. Alcaloides β -carbolínicos não foram reportados no gênero *Cestrum*, apenas na família, singularmente na espécie *Vestia foetida*, membro da tribo Cestreae, junto à *Cestrum* e *Sessea*. O gênero *Vestia* não ocorre no país, portanto a identificação de alcaloide β -carbolínico em espécies do país e do gênero *Cestrum* é sem precedentes.

A investigação da toxicidade *in vitro* de extratos e frações da espécie refletiu sua atividade em organismos de variada complexidade biológica: indivíduos microscópicos causadores de infecções, organismos de vida livre de diferentes habitats, exemplares de mono e eucotiledôneas, além dos animais superiores relatados em literatura. Este variado perfil toxicológico esclarece que atividades

prejudiciais, como a hepatotoxicidade em gado ocasionada pela espécie, não descarta possíveis aplicações vantajosas, especialmente avaliando diferentes doses.

Portanto, indícios de toxicidade não devem ser considerados obstáculos e sim como incentivo à investigação de atividades em determinada espécie vegetal. Tendo como base a influência ao gado bovino, foram desveladas atividades que devem ter investigação aprofundada, como observado nos ensaios preliminares de citotoxicidade a linhagens cancerígenas (confirmando o potencial evidenciado por Szabo (2015) em *Artemia salina*), avaliação alelopática em diferentes exemplares, alterações morfoanatômicas incompatíveis com o desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* (SZABO, 2015) e atividade sobre promastigotas.

A comprovação das atividades biológicas de uma determinada planta pode iniciar um processo de desenvolvimento de um novo produto no mercado que pode movimentar o setor industrial farmacêutico. A utilização de espécies vegetais com atividades comprovadas, leva à preservação das áreas onde se localiza, evitando sua extinção. Ainda, valoriza a vegetação nativa da região, conscientizando a população sobre a importância do meio ambiente para o desenvolvimento desta e de outras espécies com possíveis propriedades farmacológicas.

É imprescindível a continuidade da investigação de *Cestrum intermedium*, aprofundando ensaios de atividade biológica, bem como o estudo fitoquímico. A partir do estudo iniciado, características inéditas foram descritas, contribuindo para a descrição anatômica microscópica, histoquímica, físico-química, química e de atividades biológicas. O avanço no estudo fitoquímico trouxe à luz componentes nunca encontrados no gênero, caracterizando uma nova abordagem para estudos futuros. Os ensaios biológicos preliminares denotam possível atividade citotóxica *in vitro* a linhagens tumorais, assim como atividade leishmanicida *in vitro* e presença de atividade alelopática, sinalizando atividades biológicas dignas de investigação aprofundada.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, E.; SANTOS, H. L. dos. Intoxicação experimental por coereana Mart. Ex. Sendt. (Solanaceae) em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 30, n. 6, p. 875-883, 1995.
- AHMAD, K. J. Cuticular studies with special reference to abnormal stomatal cells in *Cestrum*. **Journal of the Indian Botanical Society**. v. 43, p.165-177, 1964.
- AKEMA. **Allantoin** 2019. Disponível em: < www.akema.it > pdf > ALLANTOIN>. Acesso em: 12/02/2020.
- AL-REZA, S. M. et al. Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essencial oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 96. p. 86-92, 2010.
- ARAÚJO, L. U. et al. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 25. p. 460-466, 2010.
- ASHIHARA, H. et al. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**. v. 69. p. 841-856, 2008.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. **Annual Book of ASTM Standards: Metals Test Methods and Analytical Procedures**. v.3, n.2 e 3, 1983.
- ATAÍDE, G. da M. et al. Plantas tóxicas a bovinos: análise dos processos de dispersão e regeneração de espécies. **Agrarian Academy**. v.6. p. 246-260, 2019.
- BANDARRA, P. M. et al. Intoxicação natural por *Cestrum intermedium* em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 39, n. 1. p.262-265, 2009.
- BAQAI, F. T. **Phytochemical studies of Cestrum species (family Solanaceae)**. Tese (288f). Doutorado em Filosofia. International Centre for Chemical Sciences, University of Karachi, 1999.
- BARBAKADZE, V. et al. Allantoin and Pyrrolizidine Alkaloids free wound healing compositions from *Symphytum asperum*. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**. v.3, p. 159-164, 2009.

BARNES, J. P. et al. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987.

BECKER, L. C et al. Final report of the safety assessment of allantoin and ut related complexes. **International Journal of Toxicology**. v.29, p.84-97, 2010.

BEÇAK, W. ; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v. 1, p. 33–37, 1976.

BEGUM, A. S.; GOYAL, M. Research and medicinal potential of the genus *Cestrum* (Solanaceae) – a review. **Pharmacognosy Reviews**. v. 11, p. 320-332, 2007.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University: Ames, 1976.

BHATTACHARJEE, I. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum diurnum* (L.) (Solanales: Solanaceae). **African Journal of Biotechnology**. v. 4, p. 371-374, 2005.

BOECHAT, V. C. **Ocorrência de *Leishmania infantum* e alterações histológicas associadas no trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados**. Dissertação (78f.). Mestrado em Ciências. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2015.

BORGES, K. N. et al. Contribuição ao estudo da flora medicinal da microrregião de Feira de Santana (BA). **Sitientibus**. v. 3, p. 101-116, 1986.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Germinação: do básico ao aplicado. São Paulo: Artmed. 2004.

BRAGA, F. C. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Cap. 6: Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BRANDÃO, M. D. G. L. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Cap. 4: Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz. 6. ed., v. 1. Brasília: Anvisa, 2019.

BRASIL. **Biodiversidade Brasileira**. 2014. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 23/05/2014.

BREVIS, C. et al. Huevil (*Vestia foetida*) poisoning of cattle in Chile. **Veterinary Record**. v. 156, p. 452-453, 2005.

CÂNDIDO, A. C. da S. **Atividade alelopática de *Croton doctoris* sobre a germinação, crescimento e aspectos fisiológicos e bioquímicos em laboratório e casa de vegetação**. Tese (89f.) Doutorado em Agronomia - Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2011.

CAO, R. et al. β -carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Current Medicinal Chemistry**. v.14, p. 479-500, 2007.

CHAKRABORTY, A. K; RANGARI,V. D. Semsynthetic modification and immunomodulatory activity studies of 19 α -H lupeol esters. **Pelagia research Library – Der Pharmacia Sinica**. v.2, p. 198-211, 2011.

CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta**. v. 129, p. 167-174, 1976.

CHOZE, R. Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas. Trabalho de Conclusão de Curso (40f.). Curso de Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 106, p. 290-302, 2006.

COSA, de G. M. T. Estudio morfoanatômico de órganos vegetativos en Cestroideae (Solanaceae) III. Tribu Schwenckieae. **Kurtziana**. v. 23, p. 9-25, 1994.

COSTA-NETO, E. M. Zoopharmacognosy, the self-medication behavior of animals. **Interfaces Científicas – Saúde e Ambiente**. v. 33, p.61-72, 2012.

COUTINHO, L. T. et al. Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) no agreste de Pernambuco – Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. v.14, p. 352-359, 2013.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: University Press, 1981.

CUARTAS, Y.;CASTAÑO, E. Descripción bontánica y fitoquímica del jazmín de noche (*Cestrum nocturnum* L.). **Boletín científico do museo de história natural**. v. 12, p.17-23, 2008.

D'ABROSCA, B. et al. Structural characterization of phytotoxic terpenoids from *Cestrum parqui*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 2681-2688, 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunology Methods**. v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DEY, P. et al. Therapeutic value of steroidal alkaloids in cancer: current trends and future perspectives. **International Journal of Cancer**. v. 145, p.1731-1744, 2019.

EHATA, M. T. *In vitro* antiprotozoal and cytotoxic activity of the aqueous extract, the 80% methanol ectract and its fractions from the seed of *Brucea sumatrana* Roxb. (Simaroubaceae) growing in Democratic Republic of Congo. **Chinese Medicine**. v.3, p. 65-71, 2012.

FERREIRA et al. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**. v. 23, p. 42-46, 2000.

FIORENTINO, A. et al. Lignans, neolignans and sesquilignans from *Cestrum parqui* l'Her. **Biochemical systematics and ecology**. v. 35, p. 392-396, 2007.

FISCHER, D. B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**. v. 16, p. 92-96, 1968.

FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 6^a ed. Scotland: Wiley, 2010.

FURLAN, F. H. et al. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p. 281-284, 2008.

GAHAN, P. B.; KALINA, M. The use of tetrazolium salts in the histochemical demonstration of succinic dehydrogenase activity in plant tissues. **Histochemie**. v. 14, p. 81-88, 1968.

GALLEGO, D. C. **Cestrum de Colombia (Solanaceae): estudio taxonómico de las especies de tricomas simples**. Dissertação (67f.). Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Nacional da Colômbia. Bogotá, 2011.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Paris: Gauthier-Villars, v. 1, 1969.

GHENO-HEREDIA, Y. A. et al. Las plantas medicinales de la organización e parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. **Polibotánica**. V. 31, p. 199-251, 2011.

GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of Bioactive Natural Products. In COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products. Determination, Isolation, and structural determination**. CRC Press, NW, 2 ed., p. 13-15, 2008.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. Produtos naturais ativos em leishmaniose. **Revista Fitos**. v.1, p. 43-51, 2005.

GLENNON, R. A. et al. Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. **Drug and Alcohol Dependence**. v.60, p. 121-132, 1999.

GOYAL, S. **Natural Products – Phytochemistry, Botany and Metabolismo d Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Cap. 6, Ecological role of alkaloids. Springer, 2013.

GRANDI, T. S. M. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v.3, n. 2 supl.1, p. 185-224, 1989.

HARAGUCHI, M. **Plantas tóxicas de interesse na pecuária**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal. São Paulo, 2003.

HENRIQUES, A. T. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Cap. 29, Alcalóides: generalidades e aspectos básicos, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre: Editora UFSC e UFRGS, 2010.

HODGES, L. D. Antiprotease effect of anti-inflammatory lupeol esters. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 252, p. 97-101, 2003.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 33-38, 2004.

JÁUREGUI, D. et al. Estudios anatómicos foliares en Solanaceae de Venezuela. IV. Anatomía foliar de las especies *Cestrum biggibosum* Pittier, *C. microcalyx* Francey, *C. potaliifolium* Dunal, *C. racemosum* Ruiz et Pavón y *C. salicifolium* Jacq. miembros de la tribu Cestreae-Solanaceae. **Pittieria**. v. 28, p.17-30, 1998.

JÁUREGUI, D., et al. Estudios anatómicos foliares en Solanaceae de Venezuela. V. Anatomía foliar de once especies de *Cestrum* L. **Acta Científica Venezolana**. v. 51, p. 69-77, 2000.

JÁUREGUI, D.; BENÍTEZ, C. E. Anatomía foliar de siete especies de *Cestrum* L. (Solanaceae) y clave para especies de Venezuela. **Acta Científica Venezolana**. v. 58, p.75-83, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1985.

KINGSBURY, J. M. **Toxic plants**. Cap. 1, The problem of poisonous plants. New York: Columbia University press, 1979.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Editora BASF, 2ª ed., 2000.

KLEIN-JUNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Cap. 20, Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. Porto Alegre: Artmed, 2017.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. 1ª ed. Florianópolis: Editora FATMA, 2004.

KRAUS, J. E. ; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997.

KRISHNAMURTHY, K. V. Light microscopic cytochemistry. In: **Methods in cell wall cytochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1999.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, 1983.

LAINE, A. E. et al. Pharmacological importance of optically active tetrahydro- β -carbolines and synthetic approaches to create the C1 stereocenter. **Molecules**. v. 19, p. 1544-1567, 2014.

LAKSHIMI, V. et al. Lupeol and lupeol in streptococin-induced diabetic rats. **Natural Products**. v.10, p.113-122, 2014a.

LAKSHIMI, V. et al. Diabetic activity of lupeol and lupeol esters protect the gastric ulcer in rats. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**. v.17, p.138-146, 2014b.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Sao Paulo: EPU, 1986.

LEAN, M. E. H. **Teas, cocoa and coffee**. Cap. 2, Purine Alkaloids: A focus on caffeine and related compounds in beverages. Wiley-Blackwell, 2011.

LISCOVSKY, I.J.; COSA, M. T. Anatomia comparativa de hoja y tallo em los representantes de Cestreae G. Don (Solanaceae) de Argentina. **Gayana Botanica**. v. 62, p. 33-43, 2005.

LOPES, A. C. A; NASCIMENTO, W. M. Dormência em sementes de hortaliças. **Documentos Embrapa Hortaliças**. 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2ª ed. São Paulo, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 4ª edição. São Paulo, 2008.

MACIAS, F. A. et al. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MADUREIRA, M. do C. de. et al. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe Islands. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 23-29, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n.1, p.176-177, 1962.

MARINHO, J. B. R. Comparação dos efeitos das folhas de *Cestrum axillare* Vell. com saponinas isoladas em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p. 852-861, 2018.

MARTINS, C. R. et al. Solubilidade de substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

McKEOUGH, V. L. et al. Suspected *Vestia foetida* poisoning in goats. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 53, p. 353-355, 2005.

McMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**. v. 23, p. 99-108, 1948.

MENTZ, L. A. et al. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**. v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.

MERINO, F. Z. **Estudo morfonantômico, fitoquímico, farmacológico e biológico das partes aéreas de *Senecio westermanii* Dusén (Asteraceae)**. Tese (199f) Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, 2018.

MESQUITA, A. T. **Estudos cromossômicos em 16 espécies pertencentes à família Solanaceae Juss.** Dissertação (96f). Universidade Estadual de Campinas, 2016.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** Oxford: Clarendon Press, v. 1, 1950.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica.** v. 45, p. 31-34, 1982.

MILLER, F. A.; WILKINS, C. H. Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions. **Analytical Chemistry.** v. 24, p. 1253-1294, 1952.

MISSINA, J. M. et al. Effects of Decavanadate Salts with Organic and Inorganic Cations on *Escherichia coli*, *Giardia intestinalis*, and Vero Cells. **Inorganic Chemistry.** v.57, p. 11930-11941, 2018.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica.** v. 47, n.1, p.1-19, 1979.

MOURA, D. J. **Estudo dos Alcaloides β -carbolínicos em diferentes modelos biológicos.** Dissertação (132f) Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

OSU, Oregon State University. Botany Basics, 2020. Disponível em: <pace.oregonstate.edu › files › pdf › ch01_botany>. Acesso em: 26/02/2020.

NAIR, J. J. et al. Isolation of di(2-ethylhexyl) phthalate from a commercial South African cognate herbal mixture. **South African Journal of Botany.** v. 80, p. 21-24, 2012.

NISHTHA, R.; RAO, A. Phytochemical analysis and anatomical study of two species of *Cestrum* from Chandigarh. **Internation Journal of Pharmaceutical Science and Research.** v. 8, p. 5234-5240, 2017.

PASTORE, G. et al. Usos populares de espécies de Lauraceae, Rosaceae, Curcubitaceae, Fabaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Malvaceae, Pedaliaceae. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar.** v. 6, 2002.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology.** 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980.

PERSOONE, G.; WELLS, P. G. **Artemia in aquatic toxicology: a review**. Belgium: Universa Press, Volume 1, 1987.

PHENOMENEX. **Solvent miscibility**. 2020. Disponível em: <<https://www.erowid.org/archive/rhodium/pdf/solvent.miscibility.pdf>>. Acesso em: 28/07/2020.

PINHEIRO, P. *Giardia lamblia*: sintomas, transmissão e tratamento. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/doencas-infecciosas/parasitoses/giardiose/>>. Acesso em: 02/12/2019.

PNA. About potassium nitrate. Disponível em: <<http://www.kno3.org/en/about-potassium-nitrate/uses-of-potassium-nitrate>>. Acesso em 04/12/2019.

PRASAD, M. P. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant potential and antimicrobial activities in three species of *Cestrum* plants. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. v. 4, p. 673-678, 2013.

PRICE, M. L. et al. A critical of evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 26, p. 1214-1218, 1978.

PUBCHEM. **Potassium Nitrate**. 2020a. United States National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24434>>. Acesso em 13/02/2020.

PUBCHEM. **Allantoin**. 2020b. United States National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/204>>. Acesso em 13/02/2020.

QUINTAS, A. T. Novo material de apoio para cortes histológicos. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul**. v. 6, p. 51-53, 1963.

RATES, S. M. K. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Cap. 34: Metilxantinas. Florianópolis, 2010.

RATES, S. M. K. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Cap.26: Metilxantinas. Porto Alegre: Artmed, 2017.

REFLORA. **Cestrum L. accepted names in Brazil**. 2020a. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=en&grupo=5&familia=null&genero=cestrum&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=SIM&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODO&origem=TODO®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODO&mostrarAta=SUBESP_VAR&opcoesBusca=NOME_ACEITO&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica>. Acesso em: 11/08/2020.

REFLORA. Exsicata de *Cestrum intermedium* depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba. 2020b. Disponível em: <reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=230048797>. Acesso em: 07/08/2020.

RIET-CORREA, F. et al. Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. **Editorial agropecuária hemisferio sur S.R.L.** Montevideo, 1993.

RISS, T. L. **Assay Guidance Manual**. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 07/03/2020.

RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no povoado de Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.8, p.1-7, 2006.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**. v. 61, p. 33–36, 1972.

ROSSETTI, A. C. P. A; CORSI, M. Plantas tóxicas de interesse pecuário. **Projeto CAPIM – Pesquisa e Extensão ESALQ-USP**, 2009.

SAEIDNIA, S. Are medicinal plants polluted with phthalates? **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 21, 2013.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer letters**. v. 285, p. 109-115, 2009.

SANTANA, A. L. et al. Atualidades sobre giardíase. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 102, p. 7-10, 2014.

SANTOS, R. I. dos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Cap. 16, Metabolismo básico e origem de metabólitos secundários. 6ª ed. Florianópolis e Porto Alegre: Editora UFSC e UFRGS, 2010.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *In*: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (Ed.) **Proceedings of the Second North America Tannin Conference on Plant Polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum Press, 1992.

SCHENKEL, E. P. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. Cap. 35, Plantas tóxicas. Florianópolis e Porto Alegre: Editora UFSC e UFRGS, 2002.

SCHIPSEMA, J. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Cap. 31, Alcaloides Indólicos. Florianópolis e Porto Alegre: Editora UFSC e UFRGS, 2010.

SCHRIPEMA; J.; DAGNINO, D. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Cap. 24, alcaloides Indólicos. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SCHVATSMAN, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Cap. 23, Domissanitários e Plantas Ornamentais. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

SILVA, A. T. M. et al. Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and *in vitro* evaluation of cancer cell growth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 53, 2017.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 344-351, 2005.

SILVA, R. E. S. **Estudo químico de *Cestrum laevigatum* Schlecht (Solanaceae)**. Dissertação (148f) Mestrado em Química Orgânica. Universidade Federal de Fortaleza, 2009.

SILVA, S. do N. et al. *Cestrum* L. (Solanaceae) da mata higrófila do Estado da Bahia, Brasil. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. v. 25, p.157-166, 2003.

SIQUEIRA, J. M. et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**. v. 21, p. 557-559, 1998.

SOARES, E. L. de C. *et al.* **O gênero *Cestrum* L. (*Solanaceae*) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2007. Disponível em: <
<http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/botanica58/artigo10.pdf> >.
 Acesso em: 23/05/2020.

SOARES, E. L. de C. **Estudos taxonômicos em *Solanaceae* lenhosas no Rio Grande do Sul, Brasil.** Dissertação (230f.) Mestrado em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

SOARES-BEZERRA, R. J. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v.40, p.139-149, 2004.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Cap. 1: Biodiversidade no Brasil. Porto Alegre: Artmed, 2017.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 82, p. 7738–7742, 1985.

SUN, B. *et al.* Structures of new β -carboline-type alkaloids with antiallergic effects from *Stellaria dichotoma*. **Journal of Natural Products.** v.67, p.1464-1469, 2004.

SZABO, E. M. *et al.* Physical-chemical parameters determination and preliminary phytochemical screening of *Cestrum intermedium* Sendtn. (*Solanaceae*). **Visão Acadêmica.** v. 15, n. 4, p. 5-16, 2014a.

SZABO, E. M. **Avaliação preliminar da ecotoxicidade dos extratos das folhas e cascas de *Cestrum intermedium* Sendtn. (*Solanaceae*).** Trabalho de Conclusão de Curso (48f) Tecnologia em Processos Ambientais – Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014b.

SZABO, E. M. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica *in vitro*) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (*Solanaceae*).** 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

THE PLANT LIST. **Classificação taxonômica de *Cestrum intermedium***. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2713545>>. Acesso em: 16/08/2020.

TROPICOS. **Distribuição geográfica de Solanaceae**. 2020a. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000282?tab=maps>>. Acesso em: 07/08/2020.

TROPICOS. **Distribuição geográfica de *Cestrum***. 2020b. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/40004909?tab=maps>>. Acesso em: 07/08/2020.

TROPICOS. **Classificação taxonômica de *Cestrum intermedium* Sendtn.** 2020c. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/29600541>>. Acesso em: 07/08/2020.

TURNOCK, J. et al. N-trans-feruloyltyramine from two species of the Solanaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, p. 209-211, 2001.

USDA. **Livestock and poultry: world markets and trade**. 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 30/09/2019.

VAZ, N. P. **Alcalóides Esteroidais dos Frutos Maduros de *Solanum caavurana* Vell.** Dissertação (101f) Mestrado em Química - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

VEGA, C. et al. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing betagalactosidase. **Parasitology Research**. v. 95, p. 296-298, 2005.

VENDRUSCOLO, G. V. **Diversidade e distribuição de Solanaceae em formações vegetais altomontanas no sul do Brasil**. Tese (165f.) Doutorado em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

VIGNOLI-SILVA, M. **O Gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Brasil extra-amazônico**. Tese (323f) Doutorado em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

VON POSER, G. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**, Cap. 3: A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. Artmed, 2017.

WAMBUGO, D. M. The World's Largest Exporters of Beef. **WorldAtlas**, 2018. Disponível em: <worldatlas.com/articles/the-world-s-largest-exporters-of-beef.html>. Acesso em: 30/09/2019.

WANG, K. et al. Peganumine A, a β -carboline dimer with a new octacyclic scaffold from *Peganum harmala*. **Organic Letters**. v.16. p. 4028-4031, 2014.

WENZL, M. V, et al. Site-directed mutagenesis of aldehydedehydrogenase-2 suggests three distinct pathways of nitroglycerinbiotransformation. **Molecular Pharmacology**, v.80, p. 258–266, 2011.

WOUTERS, A. T. B. et al. Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p. 47-51, 2013.